



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

**Efeitos da associação de estratégias de interferência de microRNAs na indução de apoptose mediada por citrato de ródio livre e associado à nanopartículas de maghemita em cultura de células de carcinoma mamário humano**

**JOSÉ ELOÍSIO FERREIRA DA SILVA**  
**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro

**Brasília-DF**  
**2019**

JOSÉ ELOISIO FERREIRA DA SILVA

**Efeitos da associação de estratégias de interferência de microRNAs na indução de apoptose mediada por citrato de ródio livre e associado à nanopartículas de maghemita em cultura de células de carcinoma mamário humano**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro

Brasília  
2019

Dedico este trabalho a minha amada família.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me guiar.

Agradeço à minha família, pelo constante apoio e incentivo que sempre me deram. Todo carinho e compreensão de meus irmãos (Liana e Elano), dos meus pais (Rita e José) e minha esposa Karine.

À prof. Dra. Marcella Lemos pela oportunidade, confiança e paciência.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e a cada um de seus membros atuais ou passageiros, Ana Luisa, Natália, Diogo, Nihi, Melissa, Daisy, Lais, Barbara, Stefanny, Thamis, Karen, Wellington e Christian onde nestes pude encontrar muito mais que colegas, mas uma segunda família, onde compartilhamos momentos felizes e tristes. Em especial a Bruna, Ingrid, Melissa, Nihi e Marcia, onde estas tiveram o papel de co-orientação na minha dissertação e na minha vida que venho trilhando aqui. Agradeço por cada chamada de atenção.

A todos do laboratório de Tecnologia para Terapia Gênica à Fran e a Stefanny de novo, por toda a ajuda e amizade. Agradeço também ao Professor Ricardo Titze por toda colaboração, discussão sobre os meus dados obtidos.

A professora Izabel da Faculdade de Ceilândia, na qual teve toda a disponibilidade para discutir sobre a estatística de meus dados.

Aos professores do Bloco K Térreo e aos respectivos grupos de pesquisa, pela colaboração e prestatividade.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPDF pela viabilização do trabalho.

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Crescimento celular destacando o câncer in situ e câncer invasivo. ....	12
Figura 2: Fatores de risco para surgimento do câncer.....	13
Figura 3: Carcinoma lobular in situ (DLIS) e Carcinoma ductal in situ (DCIS).....	15
Figura 4: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*.....	16
Figura 5: Linhagens de mama tumoral.....	18
Figura 6: Estrutura molecular geral do ácido cítrico (A) e citrato de ródio (II) (B).....	21
Figura 7: Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por diferentes métodos: liberação controlada (A) e terapia convencional (B).....	22
Figura 8: Esquema de associação química de uma nanopartícula de maghemita com uma molécula de citrato de ródio (II).....	25
Figura 9: Biogênese ou geração do microRNA e o mecanismo de inibição de síntese proteica.....	30
Figura 10: Alvos do mir-34a confirmados experimentalmente.....	32
Figura 11: Fluxograma experimental adotado nessa dissertação.....	36
Figura 12: Efeito dos tratamentos com Citrato de Ródio livre (CR) e associado a nanopartículas de Maghemita (MRC) sob a viabilidade de células de adenocarcinoma mamário das linhagens MDA-MB-231 (A e B) e MCF-7 (C e D) após 48 h.....	44
Figura 13: Efeito da reposição de mir-7 e mir-34a combinado com tratamento de Citrato de ródio associado a Nanopartículas de Maghemita (MRC) na viabilidade de células da linhagem MDA-MB-231 após 48 h. ....	46
Figura 14: Efeito do tratamento com Citrato de Ródio associado a nanopartícula de Maghemita (MRC) combinado com reposição de mir-34a, sob a viabilidade de células da linhagem MCF-7 após 48 h.....	47
Figura 15: Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROS) após tratamento com Citrato de Ródio associado a nanopartículas de Maghemita (MRC) combinado com mimético de mir-34a na linhagem MCF-7. (A) Leitura após duas de tratamento. (B) Leitura após cinco horas de tratamento. (C) leitura com controle positivo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	49
Figura 16: Quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROS) da nanopartícula de citrato de ródio associado a Maghemita (MRC) e mimético mir-34a, sob a linhagem MCF-7. (A) leitura após 30horas; (B) leitura do controle positivo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50
Figura 17: Quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROS) da nanopartícula de citrato de ródio associado a Maghemita (MRC) e mimético mir-34a, sob a linhagem MCF-7. (A) leitura após 48 horas; (B) leitura do controle positivo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50
Figura 18: Morfologia de células de linhagem cancerosa, MCF-7. (A) Células não tratadas; (B) Células tratadas com mimético mir-34a; (C) Células tratadas com mimético mir-34a + nanopartícula MRC; (D) Células tratadas somente com a nanopartícula MRC.....	52
Figura 19: Avaliação do perfil de morte celular induzido pelas nanopartículas MRC e mimético mir-34a (Tratamentos após 48h).....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(-COOH) – Ácido carboxílico  
(-OH) - hidroxila  
( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)- maghemita  
ACS - American Cancer Society  
Anexina- V FITC - Flouresceína-5-isotiocianato  
BSA - Albumina sérica bovina  
CAT- Catalase  
CDIS - Carcinoma ductal in situ  
CdKs – Quinases dependentes de ciclinas  
CLIS - Carcinoma lobular in situ  
CME- concentração mínima efetiva  
CMT - concentração mínima tóxica  
CR - Citrato de Ródio Livre (II)  
DCFH-DA – 2',7'-Diacetato de diclorofluoresceína  
DMEM- *Dulbecos's modified Eagle's médium*  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
EFGR - fator de crescimento epidermal humano  
ER - Receptores de estrógeno  
EROS – Especies Reativas de oxigênio  
GSH- Glutaciona  
GSH-Px- Glutaciona peroxidase  
GSSG- Disulfeto de glutaciona  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- peróxido de hidrogênio  
HEPES- 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfico  
HER-2 - Promotor de crescimento  
HPV- vírus papiloma humano  
INCA - Instituto Nacional do Câncer  
LNN - / câncer de mama linfonodo negativo  
MC - Nanopartículas de maghemita  
MCF-7 - Carcinoma mamário humano  
MDA-MB-231 - Carcinoma mamário humano  
MGH -Nanopartícula de maghemita  
miRNA- microRNA  
MRC - Nanopartículas de maghemita associadas ao citrato de ródio (II)  
NMs - Nanopartículas magnéticas  
NPs – Nanopartículas  
PBS - Tampão fosfato salino  
PI -Iodeto de propídio  
PR - Progesterona  
PrB- Proteína retinoblastoma  
pri-miRNA- miRNA primário  
PTX - Paclitaxel  
Rh<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CR)<sub>4</sub> - Carboxilatos de ródio (II)  
RISC- Complexo indutor de silenciamento de RNA  
RNAi – RNA de interferência  
RNase- ribonuclease  
SFB - Soro fetal bovino  
SOD- Superóxido dismutase

## RESUMO

O câncer de mama é o segundo mais incidente no mundo. A nanobiotecnologia usa materiais em escala nanométrica e apresenta potencial para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas, possibilitando soluções para limitações no diagnóstico e tratamento de várias doenças. Em estudos preliminares, conduzidos pelo nosso grupo, foi demonstrado que o tratamento com células tratadas com citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita (MRC) resultou em maior citotoxicidade em células de carcinoma mamário do que em células epiteliais saudáveis e do que citrato de ródio livre (CR). O uso de terapias combinadas pode favorecer uma melhor resposta terapêutica, pois pode levar ao aumento da sensibilização de células alvo ao tratamento, se tornando uma estratégia promissora, especialmente de células que apresentam quimiorresistência. O uso de microRNAs, como mir-34a e mir-7, tem sido relacionado à maior sensibilização das células a quimioterápicos como doxorrubicina, cisplatina e paclitaxel e, portanto, tem revelado potencial uso na terapêutica de células quimioressistentes. Células tumorais da mama apresentam padrões aberrantes na expressão de microRNAs que favorecem a tumorigênese e a regulação negativa de mir-34 e mir-7 tem sido associada a indução de citotoxicidade. Neste estudo foi avaliado o potencial terapêutico do uso combinado da terapia com MRC (250  $\mu$ M) e com a reposição de mir-34a e mir-7 (*mimics* a 30 nM) em células de carcinoma mamário (linhagens MDA-MB-231 e MCF-7). Além disso, foram avaliados os efeitos desta terapia na redução da viabilidade celular e na indução de alterações morfológicas, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e morte celular, por meio de técnicas de espectrofotometria, microscopia e citometria. Foi observado que mir-34a induziu maior citotoxicidade do que mir-7. A terapia com MRC e reposição de mir-34a induziu maior citotoxicidade do que os tratamentos exclusivos com MRC ou *mimics* de mir-34a em MCF-7. Este efeito foi associado a alterações morfológicas, o aumento da produção de EROs e de apoptose. Portanto, o uso terapêutico de *mimics* de mir-34a potencializou o efeito citotóxico de MRC e isto pode ser resultado da interferência de RNAs associados a regulação da proliferação celular, revelando, assim, que este microRNA tem um excelente potencial biotecnológico para aplicação na terapêutica do câncer.

**Palavras chaves:** adenocarcinoma mamário; mir-34a; mir-7; espécies reativas de oxigênio, apoptose; nanopartículas magnéticas.

## **ABSTRACT**

Breast cancer is the second most incident in the world. Nanobiotechnology uses nanometric materials and presents potential for the development of therapeutic tools, allowing solutions for limitations in the diagnosis and treatment of various diseases. In preliminary studies conducted by our group, it was shown that treatment with cells treated with rhodium citrate associated with maghemite nanoparticles (MRC) resulted in greater cytotoxicity in mammary carcinoma cells than in healthy epithelial cells and than rhodium citrate free (CR). The use of combination therapies may favor a better therapeutic response, as it may lead to increased sensitization of target cells to the treatment, becoming a promising strategy, especially of cells that have chemoresistance. The use of microRNAs, such as mir-34a and mir-7, has been linked to the increased sensitization of cells to chemotherapeutics such as doxorubicin, cisplatin and paclitaxel and therefore has revealed potential use in therapeutics of chemoresistant cells. Tumor cells of the breast present aberrant patterns in the expression of microRNAs that favor tumorigenesis and the negative regulation of mir-34 and mir-7 has been associated with induction of cytotoxicity. In this study, the therapeutic potential of the combined use of MRC therapy (250  $\mu$ M) and the replacement of mir-34a and mir-7 (mimics at 30 nM) in mammary carcinoma cells (MDA-MB-231 and MCF -7). In addition, the effects of this therapy on the reduction of cell viability and the induction of morphological alterations, production of reactive oxygen species (ROS) and cell death were evaluated through spectrophotometry, microscopy and cytometry techniques. It was observed that mir-34a induced greater cytotoxicity than mir-7. MRC therapy and mir-34a replacement induced greater cytotoxicity than exclusive treatments with MRC or mir-34a mimics in MCF-7. This effect was associated with morphological changes, increased production of ROS and apoptosis. Therefore, the therapeutic use of mimics of mir-34a potentiated the cytotoxic effect of MRC and this may be a result of the interference of RNAs associated with regulation of cell proliferation, thus revealing that this microRNA has an excellent biotechnological potential for application in the therapy of cancer.

**Key words: breast adenocarcinoma; mir-34a; reactive oxygen species, apoptosis**

## SUMÁRIO

### 1. INTRODUÇÃO

<b>1.1. Câncer</b> .....	11
1.1.1 – Origem e incidência.....	11
1.1.2 – Epidemiologia.....	15
1.1.3 – Linhagens celulares cancerosas de tumor de mama: MCF-7 E MDA-MB-231 .....	16
<b>1.2. Estratégias terapêuticas e suas limitações</b> .....	18
1.2.1 – Complexo de ródio.....	20
1.2.2 – Nanobiotecnologia.....	21
1.2.3 – Nanopartículas metálicas.....	23
1.2.4 – Nanopartículas de Maghemita associado ao citrato de ródio.....	24
<b>1.3. Morte celular</b> .....	25
1.3.1 – Ciclo celular e apoptose.....	25
<b>1.4. Estresse oxidativo</b> .....	27
1.4.1. Espécies reativas de oxigênio .....	27
<b>1.5. MicroRNA de interferência</b> .....	28
1.5.1. microRNA.....	28
1.5.2. Biogênese do microRNA de interferência.....	29
1.5.3. Mir-34a.....	31
1.5.4. Mir-7.....	32
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	35
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	35
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
<b>4.1. Cultivo celular</b> .....	37
<b>4.2. Tratamento das células</b> .....;	38
4.2.1 Quimioterapia com CR e MRC.....	38
4.2.2 Transfecção com oligonucleotídeos sintéticos para miR-34 e mir-7 .....	39

<b>4.4. Determinação de viabilidade celular por <i>Alamar blue</i></b> .....	40
<b>4.5. Análise de morfologia por microscopia óptica</b> .....	40
<b>4.6. Detecção de produção de EROs</b> .....	41
<b>4.7. Análise de morte celular por meio de citometria de fluxo</b> .....	41
<b>4.8. Análise estatística</b> .....	42
<b>5. RESULTADOS</b> .....	43
<b>5.1. Ensaio de viabilidade celular</b> .....	43
5.1.1 Triagem de doses de CR e MRC.....	43
5.1.2 Ensaios de interações terapêuticas entre microRNA's (mir-7 e mir-34a)....	45
<b>5.2. Quantificação das espécies reativas de oxigênio</b> .....	47
<b>5.3. Análises morfológicas induzidas por MRC e mir-34a</b> .....	50
<b>5.4. Avaliação de morte celular</b> .....	52
<b>DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>CONCLUSÃO</b> .....	57

# 1 - INTRODUÇÃO

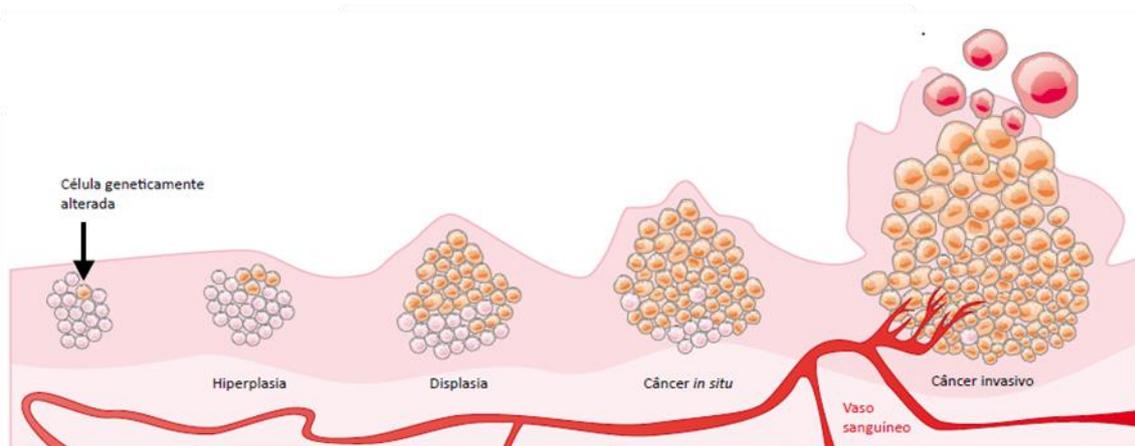
## 1.1 CÂNCER

### 1.1.1 - Origem e incidência

O câncer é uma doença que causa temor na sociedade pela sua possível gravidade. A origem da palavra “câncer” vem do latim e significa caranguejo. Este nome se deve a analogia em relação ao modo de crescimento infiltrante de células cancerosas como as patas do crustáceo que as introduz na lama de forma ligeira e move-se para todos os lados e cujas patas dianteiras são como pinças que agarram com firmeza para dificultar sua remoção. Atualmente a definição se refere a neoplasias ou tumores malignos sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células antes saudáveis e agora transformadas, que podem se diferenciar pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes. A maioria dos cânceres tem características que refletem a sua origem, dentre eles o carcinoma no qual é um tipo de câncer que deriva das células epiteliais, já os sarcomas são tumores derivados do tecido conectivo ou das células musculares (ALBERTS, 2010).

Um estímulo patológico ou fisiológico pode levar ao aumento autolimitado e localizado do número de células saudáveis, levando a proliferação celular e crescimento anormal. Tecidos com células em crescimento anormal são chamadas de neoplasias ou tumores sendo que estes podem ser localizados na camada tecidual no qual se desenvolveram e, neste caso são classificados como carcinoma. Ainda, este câncer pode atingir um estágio de desenvolvimento posterior ao tumor *in situ* (**Figura 1**) ao qual avança para outras camadas celulares ou também se disseminam, por meio da corrente sanguínea, para outras partes do corpo originando, assim, as metástases (WEINBERG, 2008).

De acordo com Fundação Nacional de Câncer de Mama - *National Breast Cancer Foundation* - (2017) tumores podem ser considerados como benignos ou malignos. Tumores benignos são caracterizados por apresentar crescimento lento enquanto que tumores malignos possuem crescimento invasivo e descontrolado.



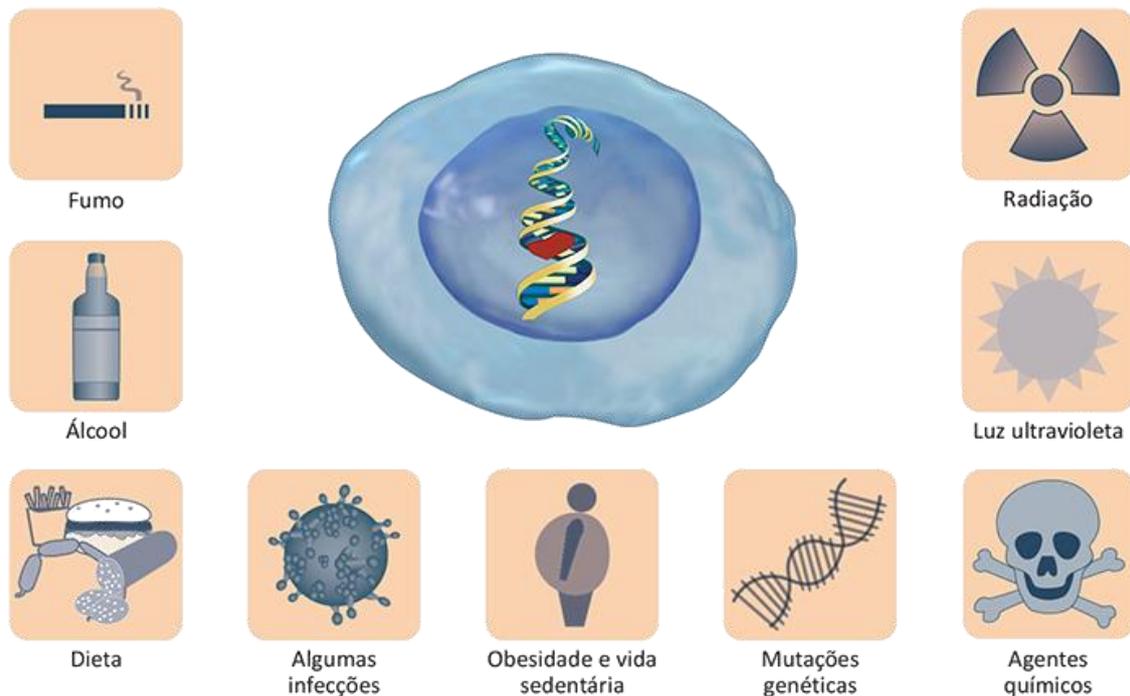
**Figura 1 – Crescimento celular destacando o tumor *in situ* e câncer invasivo.** A célula geneticamente alterada não terá mais o crescimento autolimitado, proliferando, assim, em um número massivo de células que mantêm a habilidade de se agregarem aos tecidos de origem estando com aparência razoavelmente normal (hiperplasia). Na displasia a célula citologicamente anormal, não mantém a aparência de uma célula normal, variando em tamanho e forma do núcleo. No câncer *in situ*, um grau de anormalidade mais severo no crescimento fará com que tecidos subjacentes sejam invadidos. No câncer invasivo, células do tumor primário podem formar colônias de tumores em locais distantes no organismo e este processo é conhecido como metástase.  
**Fonte:** Adaptado do livro ABC do câncer, INCA, 2011; WEINBERG, 2008.

Segundo Pasqualini (2002) há vários fatores de risco relacionados com o impacto do ambiente na promoção e progressão do câncer sendo eles de origem física, química e/ou biológica (**Figura 2**). Dentre os tumores que são desencadeados por fatores biológicos cita-se alguns agentes etiológicos associados a infecções tais como presença de papiloma vírus (HPV), vírus da hepatite B e bactéria *Helicobacter pylori* e, além disso, ressalta-se a hereditariedade (ALMEIDA; FARIAS, 2016).

Com relação aos fatores químicos destaca-se o consumo excessivo de bebidas alcoólicas e fumo os quais estão associados ao aumento na incidência de câncer na cavidade oral, laringe, faringe, esôfago, mama, colón e reto. Ainda, o consumo de uma alimentação inadequada pobre em frutas, verduras e legumes, aumenta a chance de desenvolvimento de câncer de mama, colón, próstata e esôfago. Destaca-se também que a obesidade é um fator de risco de alto impacto para surgimento de câncer de endométrio, rim vesícula biliar e mama (FERRAZ; DE SIQUEIRA, 2015).

Fatores físicos como as diversas formas de irradiação, também está implicado na formação de tumores, como por exemplo a radiação ionizante ou radiação ultravioleta, responsáveis em alguns casos de câncer de tireoide e de melanoma. Estes fatores de risco relacionados aos hábitos de vida estão relacionados com mutações que ativam proto-

oncogenes e inativam genes supressores de tumor, resultando na alteração da regulação do apoptose (PASQUALINI *et al.*, 2002).



**Figura 2 – Fatores de risco para surgimento do câncer.** O consumo de fumo e álcool em excesso, falta de alimentação saudável, fatores hereditários, acometimento por algumas infecções dentre vários outros elementos são fatores de risco que estão relacionados ao surgimento de algum tipo de câncer. Estes fatores quando combinados podem facilitar o surgimento do câncer ou agravar a saúde do paciente. Fonte: SHARMA, *et al.* 2010.

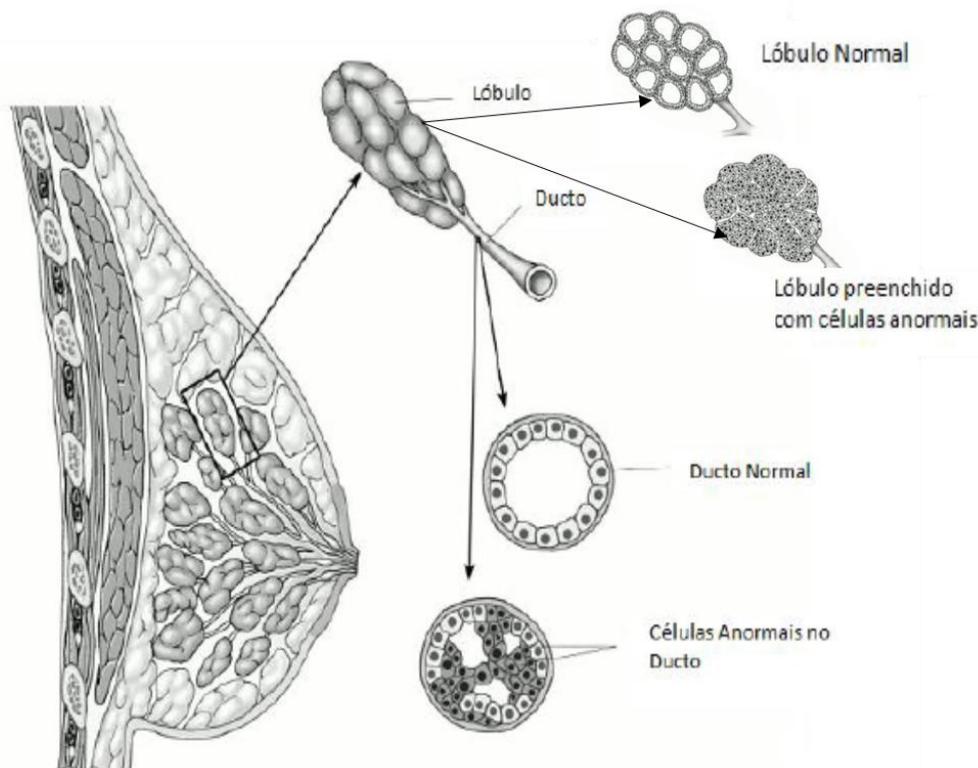
Os fatores de risco do câncer de mama são originados por vários elementos, mas aumentam por causa de problemas endócrinos que fazem parte da biologia reprodutiva da mulher (menarca precoce, menopausa tardia, uso de contraceptivos e reposição hormonal). Além disso, o risco de desenvolver câncer de mama está plenamente associado a condições de hábito de vida e dentre os principais fatores de risco destacam-se obesidade, sobrepeso, ingestão de bebida alcoólica e de fumo, dentre outros. Ainda, o câncer de mama pode surgir a partir de fatores de risco combinados com alterações genéticas que resultam no crescimento desordenado de células que apresentam potencial invasivo (SHARMA *et al.*, 2010).

A glândula mamária ou mama é um órgão que se localiza na parte anterior do tórax e está apoiada sobre o músculo peitoral maior na parte superior. A mama é composta por três estruturas principais: (1) lobos - que são constituídos por glândulas produtoras de

leite, (2) ductos que conectam os lobos aos mamilos e transportam leite e (3) tecido adiposo e conjuntivo que envolve os dutos, lobos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos e esta parte é conhecida como estroma que funciona como um tecido de sustentação. Lobos e ductos representam o tecido funcional e esta parte é denominada parênquima mamário.

As células da glândula mamária podem passar por alterações anatômicas e fisiológicas ao longo da vida como crescimento em número e tamanho da quantidade de células resultando em hiperplasia (**Figura 3**) (*American Cancer Society -ACS, 2016*). Os principais tipos de carcinomas na mama são o ductal *in situ* e o lobular *in situ*, no qual podem apresentar alterações na expressão de genes que regulam funções essenciais como proliferação, morte e diferenciação celular. A mutação sofrida pela célula proporciona vantagem seletiva para passar por uma expansão clonal. Então a progressão do tumor é induzida por sucessivos eventos de alterações moleculares, seleções e expansões clonais (AXELROD *et al.*, 2006).

Geralmente, um dos sinais mais comuns do câncer de mama é o aparecimento de nódulo indolor, duro e irregular. Dentre outros sinais podem surgir linfonodos palpáveis na axila e a presença de edema e retração cutânea, dor, inversão do mamilo, hiperemia, descamação ou ulceração de um mamilo e secreção papilar que geralmente é transparente, podendo ser rosada ou avermelhada (SILVA, RIUL, 2011).



**Figura 3- Carcinoma lobular in situ (DLIS) e Carcinoma ductal in situ (DCIS).** As células que revestem os lóbulos ou ductos sofreram alguma alteração e se tornaram células cancerosas. Fonte: Adaptado do site American Cancer Society.

### 1.1.2 – Epidemiologia

Em 2018 foram contabilizados 18,1 milhões de novos casos de câncer no mundo e a 9,5 milhões de óbitos. Dentre os diversos tipos de câncer que predominaram, em países em subdesenvolvimento, destacaram-se os casos de câncer de colo de útero, estômago, esôfago e fígado enquanto que em países desenvolvidos prevaleceram câncer de pulmão, próstata, mama feminino, colón e reto. Dentre os diversos cânceres o de mama é o segundo mais incidente no mundo (2,08 milhões de casos), exceto câncer de pele não melanoma. Além disso, o câncer de mama é o que aparece em maior frequência em mulheres, em torno de 24,2% (BRAY *et al.*, 2018).

O Instituto Nacional do Câncer estima para os anos de 2018-2019 a ocorrência de 600 mil novos casos para cada ano, tendo dentre estes, 59.700 casos de câncer de mama, tendo uma taxa de incidência de 56,33 casos para cada 100 mil mulheres (**Figura 4**) (INCA, 2018).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens		Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
					Mulheres		

**Figura 4 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma\*.** (Retirado do livro “ESTIMATIVA 2018 – Incidência de câncer no Brasil” (INCA)).

### 1.1.3 – Linhagens celulares cancerosas de tumor de mama: MCF-7 e MDA-MB-231

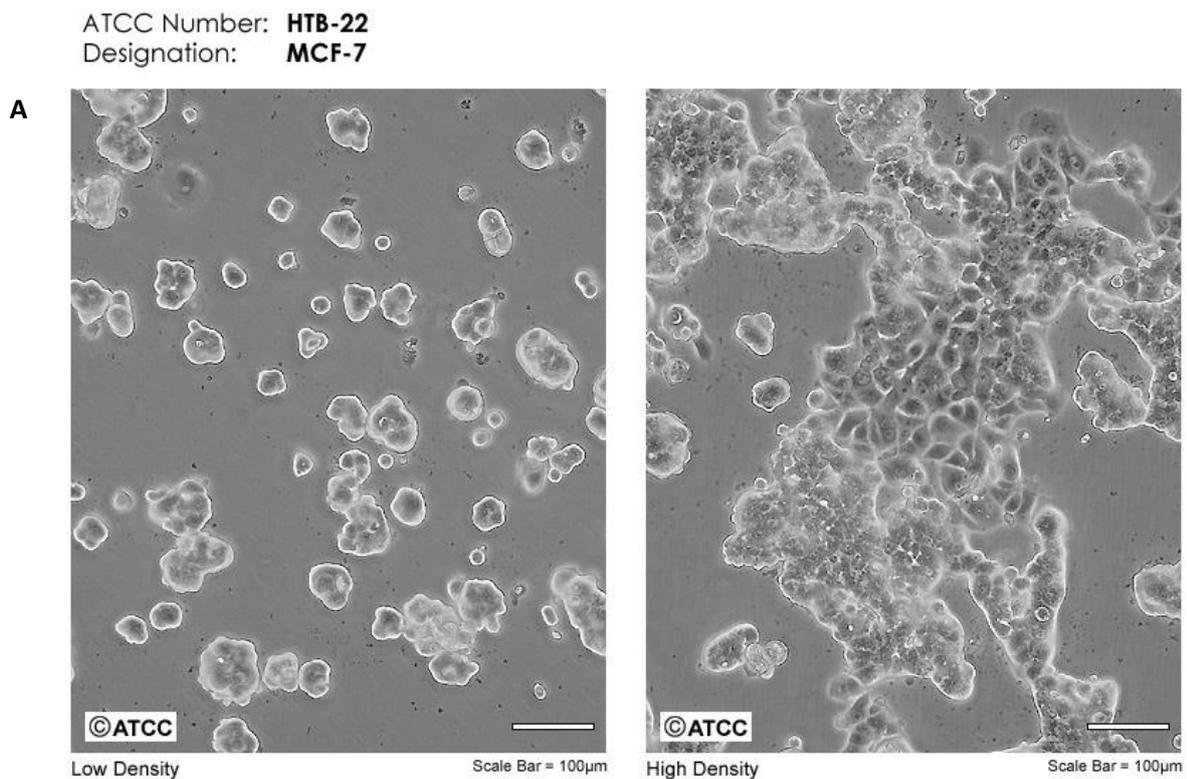
É fundamental que se conheça o efeito de substâncias e/ou compostos químicos empregados em protocolos terapêuticos em seres humanos. Os testes *in vitro* são essenciais para prever toxicidade destes compostos em diversos sistemas biológicos tais como bactérias, fungos, algas, frações de cultivo de tecidos e de células. Uma das vantagens destes testes é que resultam em menor o uso de animais em laboratório (FRAZIER, 1992; LIMA, 2006).

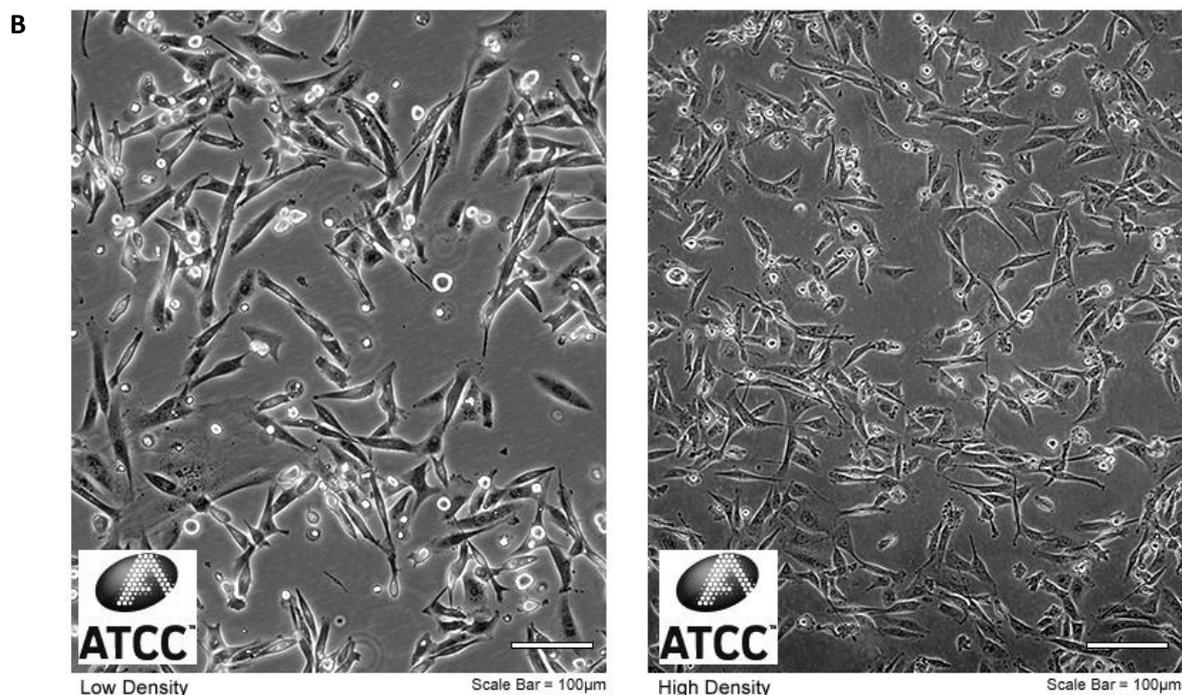
Além disso, culturas celulares são utilizadas para avaliação de atividade biológica e determinação de mecanismo de ação induzidas por substâncias ou compostos químicos. O emprego de linhagens celulares oferece a possibilidade de estudos rápidos, reprodutíveis e sensíveis, além da vantagem do controle de pH, pressão de CO<sub>2</sub>, temperatura e de pressão osmótica. Estes tipos de ensaios também permitem limitar e controlar o número de variáveis experimentais (PRADO, 2012; ROGERO *et al.*, 2003). Neste estudo foram utilizadas duas linhagens celulares de câncer de mama: a MCF-7 e a MDA-MB-231.

Células da linhagem MCF-7 (**Figura 5 A**) foram isoladas, inicialmente, de um derrame pleural de uma mulher de 69 anos que apresentava a doença metastática (baixo potencial metastático). Esta linhagem celular apresenta características moleculares positivas para a presença de receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR). Portanto, a linhagem MCF-7 é adequada para estudos de resistência a drogas antiestrogênicas.

Sabe-se que esta linhagem celular depende de estrogênio para proliferar e na ausência desse aumentam os níveis de expressão de ER. O crescimento do câncer de mama é controlado também pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER-2) (COMŞA; CÎMPEAN & RAICA, 2015).

A linhagem MDA-MB-231 (**Figura 5 B**) é uma linhagem de câncer epitelial estabelecida a partir de células de um derrame pleural originado em uma mulher com 51 anos que apresentava um adenocarcinoma mamário metastático (*European Collection Autheticated Cells Culture - ECACC, 2017*). Diferentemente da linhagem MCF-7, a linhagem MDA-MB-231 não apresenta receptores de estrogênio o que a torna, assim, mais resistente à quimioterapia (BANERJEE *et al.*, 2016).





**Figura 5- Linhagem de mama tumoral (A) MCF-7 (B) MDAMB-231.** Fonte: American Type Culture Collection (ATCC). (A) <https://www.atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/HTB-22.ashx>; (B) <https://www.atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/HTB-26.ashx>

## 1.2 Estratégias terapêuticas e suas limitações

De acordo com Smeltzer (2002) para determinar o melhor tipo de tratamento para o câncer de mama se utiliza da mensuração do nível de massa tumoral por meio do seu estadiamento que consiste no cálculo aproximado do tamanho do tumor. Para isso, o tumor é classificado em: estágio I (massa tumoral < 2 cm e limitados à mama), estágio II (< 5 cm com envolvimento ou não dos axilares móveis), estágio III a (tumores > 5 cm, acompanhados ou não por comprometimento de linfonodos axilares), estágio III b (lesões mais avançadas) e estágio IV (todos os tumores com metástase).

Desde da antiguidade os médicos extraíam mamas doentes, aumentando o sofrimento e morte. A mastectomia radical ou mastectomia de Halsted, era caracterizada pela retirada de toda a mama, onde esta não oferecia melhores perspectivas de curas ou probabilidade de evitar a metástase interna, além de mutilar a mama do paciente. Assim novos estudos levaram ao surgimento da radioterapia, que apesar de algumas curas estes levavam a complicações resultantes de altas doses de raio X ou a óbito alguns pacientes

durante as sessões. Futuramente a técnica de radioterapia evoluiria e seria usada em combinação com melhora da mastectomia (diminuindo a mutilação) para evitar a morte de pacientes por câncer metastático. O uso dessas técnicas associado ao surgimento da mamografia aumentaria a expectativa de vida de um paciente de câncer, pois a partir desse momento poderia levar a um diagnóstico precoce, visto que tumores em fases iniciais não eram palpáveis, sendo descobertos apenas em fases mais avançadas da doença. Por fim veio a continuação de estudos culminou pelos achados com quimioterapia e hormonioterapia com antiestrogênicos (MORA, 2013).

Atualmente, a cirurgia, radioterapia e as terapias sistêmicas como quimioterapia e imunoterapia são os tratamentos mais utilizados para o câncer; porém, são ineficazes quando a doença é diagnosticada tardiamente (MURAWA *et al.*, 2014). O progresso do câncer pode ser controlado e a doença pode ser até curada quando há diagnóstico precoce e a cirurgia é indicada quando o câncer se encontra em fase inicial. A cirurgia pode ser realizada com a finalidade diagnóstica, preventiva, curativa ou paliativa. O tratamento cirúrgico tem a finalidade de reduzir a população tumoral (DA SILVA, 2017).

Na radioterapia, radioisótopos são utilizados em doses elevadas visando justamente ao efeito do deletério da radioatividade sobre determinados tecidos. Este é um tratamento no qual usam de radiações ionizantes para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem. Esta terapia pode ser usada em combinação com a quimioterapia e outros tratamentos, como já mostrado anteriormente (CARVALHO, 1997)

Em relação à quimioterapia ainda não existem tratamentos plenamente eficientes visto a ação dos quimioterápicos ocorrer tanto em células tumorais como em células saudáveis. Esta toxicidade inespecífica resulta em toxicidade sistemática e, portanto, em efeitos adversos. Estes efeitos decorrem da distribuição do quimioterápico em tecidos não alvos (células saudáveis) e sua rápida eliminação requerendo assim, uma maior administração. Além disso, outro problema que limita a eficácia da quimioterapia se deve a resistência do tumor ao quimioterápico. Estas limitações têm motivado à pesquisas para o desenvolvimento de novas estratégias que permitam a entrega de agentes antitumorais de forma específica possibilitando, desta forma, o tratamento do tumor com menor toxicidade sistêmica e maior eficácia terapêutica (BRANNON-PEPPAS E BLANCHETTE, 2004; COUVREUR E VAUTHIER, 2006; GU *et al.*, 2007).

Outros tipos de compostos estão sendo pesquisados para o combate ao câncer. Em 2013, ensaios clínicos de fase I foram iniciados com o composto experimental miRNA-mimic do mir-34a, chamado de MRX34 (MIRNA THERAPEUTICS, 2013).

### 1.2.1 Complexos de ródio

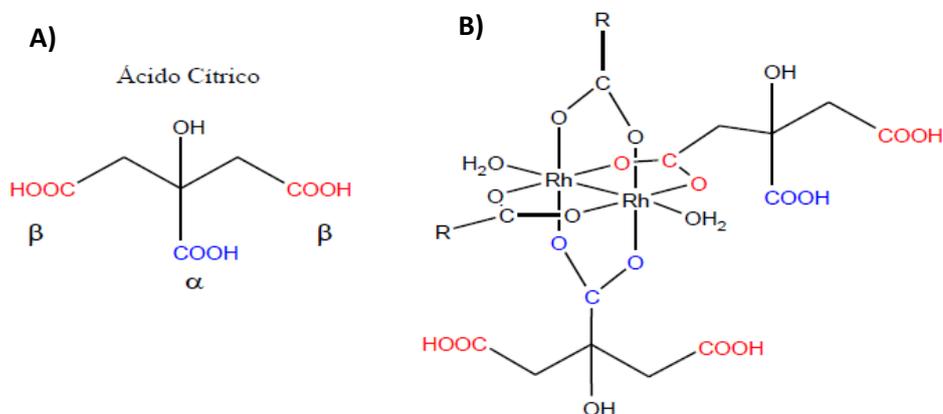
O uso de metais na medicina tem mais de 5.000 anos (ORVIG & ABRAMS, 1999) e seu uso terapêutico no combate ao câncer é datado antes do século XVI. Porém, nenhuma pesquisa sobre o uso terapêutico de metais na terapêutica do câncer foi realizada até 1960, data em que a atividade antitumoral do complexo inorgânico cis-diaminodicloroplatina (II) ou cisplatina foi descoberta. O mecanismo de ação deste complexo metálico está relacionado a capacidade deste em induzir morte celular por meio da formação de ligações covalente cruzadas entre guaninas do DNA causando distorções na dupla hélice impedindo processos vitais como replicação e transcrição do DNA (KATSAROS; ANAGNOSTOPOULOU, 2002; PASETTO *et al.*, 2006; WING *et al.*, 1984).

Apesar de seu sucesso clínico, o uso da cisplatina até o presente é limitado porque este complexo induz efeitos adversos severos. Desta maneira, novas pesquisas têm sido realizadas a fim de se descobrir novos complexos metálicos com as mesmas propriedades da cisplatina, porém, com toxicidade inespecífica reduzida (ZHANG; LIPPARD, 2003). Neste contexto, desde 1972, surgiram estudos com carboxilatos de ródio (II), complexos metálicos com atividade tumoral similar a cisplatina (DE SOUZA *et al.*, 1996; KATSAROS; ANAGNOSTOPOULOU, 2002).

Demais complexos da família dos carboxilatos de ródio são reconhecidos como agentes antitumorais em animais, porem estes apresentam pouca solubilidade em água com exceção do citrato de ródio. O citrato de ródio é hidrossolúvel, e sua toxicidade aguda não foi observada em ensaios com doses de 260 mg/kg durante 14 dias quando aplicadas em camundongos suíços portadores de ascite de Ehrlich, onde nos mesmos o uso da dose letal do composto levou a sobrevida desses animais (ZYNGIER; KIMURA; NAJJAR, 1989). Em ensaios conduzidos por Carneiro e colaboradores (2015) foi demonstrado que o uso desse composto não levou a alterações relevantes na aparência dos órgãos e parâmetros hematológicos ou histopatológicos e sintomas de intoxicação após a dose acumulada de 400 mg/kg em camundongos Balb/c. Outros complexos de ródio como acetato e butirato de ródio são altamente tóxicos em camundongos (BEAR *et al.*, 1975).

Dentre os tipos de carboxilatos de ródio, o citrato de ródio (II) é um complexo constituído por quatro moléculas de citrato e dois átomos de ródio, ligados a duas moléculas de água na posição axial, características químicas que conferem sua elevada

solubilidade em água. Esse complexo possui dois ácidos carboxílicos livres (-COOH) para cada citrato e duas hidroxilas (-OH) para moléculas de água (**Figura 6**).



**Figura 6 - Estrutura molecular geral do ácido cítrico (A) e citrato de ródio (II) (B).** Os grupos carboxílicos do ácido cítrico são observados nas posições  $\alpha$  e  $\beta$ . Na representação (b) pode ser visualizado que a coordenação com o centro dimetálico de ródio pode ocorrer com ambos os grupos. Fonte: CARNEIRO *et al.*, 2011.

### 1.2.2 Nanobiotecnologia

Nanotecnologia é uma área de estudo a qual se faz uso do material em escala nanométrica para criação de materiais funcionais, dispositivos e sistemas que apresentem novos fenômenos e propriedades que são dependentes do tamanho (DURAN, 2002). O seu ponto inicial se deu em 1959 quando Richard Feynman propôs, em uma palestra, a manipulação dos átomos sem que se afetasse as leis da natureza. Então, a partir daí uma revolução vem acontecendo por se tratar da habilidade de manipular átomos na escala nanométrica ( $10^{-9}$  metros) visando desenvolver tecnologias aplicadas às áreas da física, química, biologia, engenharia e medicina (CADIOLI; SALLA, 2015)

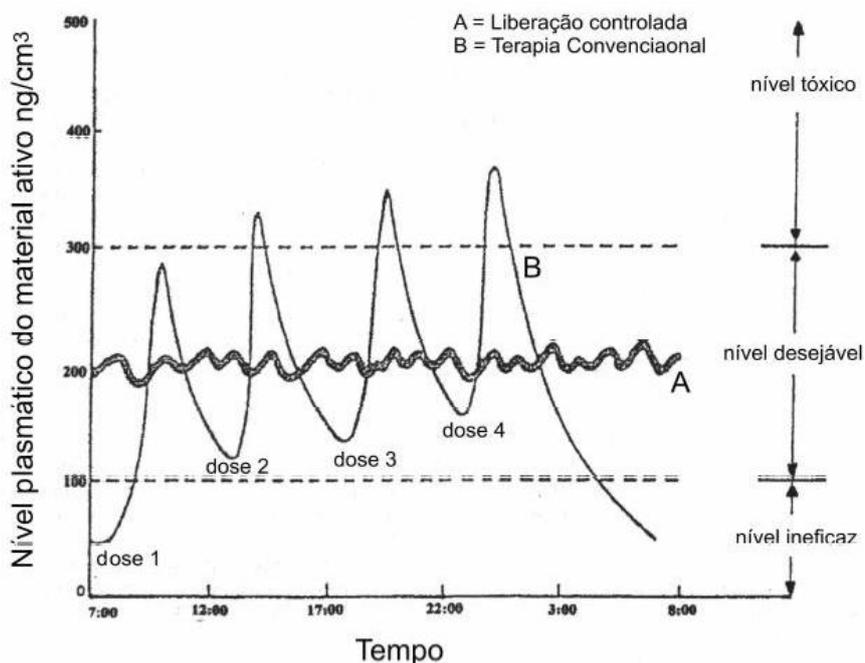
Em particular, nanobiotecnologia se refere à fusão de duas abordagens tecnológicas: a biotecnologia e a nanotecnologia. Essa área é definida como o estudo de processamento, fabricação e desenho de nanomateriais para atuação biológica ou como biomateriais, no qual, haja o uso de pelo menos um componente funcional em tamanho nanométrico (DURÁN; MARCATO; TEIXEIRA, 2011)

Ao longo de algumas décadas a nanobiotecnologia permitiu o desenvolvimento de importantes ferramentas com finalidades terapêuticas oferecendo soluções para limitações no diagnóstico, tratamento e conduta clínica de doenças humanas. Para a

nanomedicina seu uso destacou-se na regeneração de tecidos e em sistemas de liberação controlado de fármacos, hormônios e vacinas (YOKOYAMA, 2005; GU *et al.*, 2007; MALAM; LOIZIDOU; SEIFALIAN, 2009; ZHANG; WEBSTER, 2009).

Para Jamshaid (2015) o sistema de distribuição de drogas ou medicamentos é um sistema para administração de drogas, que não seja as convencionais, para isto abordagens das formulações, tecnologias e sistemas serão utilizados para elaborar o transporte de um composto farmacêutico no corpo conforme necessário para alcançar com segurança o efeito terapêutico necessário.

Os sistemas de liberação controlada são capazes de prover algum controle terapêutico seja de natureza temporal, espacial ou de ambos. Para Duran e Azevedo (2002) o objetivo dos sistemas de liberação é controlar, com uma única dosagem, a concentração do fármaco na faixa terapêutica. Ou seja, esta faixa é caracterizada pela concentração do fármaco estar acima da concentração mínima efetiva (CME) e abaixo da concentração mínima tóxica (CMT) (Figura 7) (BIZERRA *et al.*, 2016).



**Figura 7 - Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por diferentes métodos: liberação controlada (A) e terapia convencional (B).** No método de aplicação convencional administração, a concentração da droga na corrente sanguínea aumenta até atingir o nível máximo de dissolução e declina, sendo necessário um nova dose para que se mantenha o nível de concentração. A elevada concentração acima da faixa conduz a toxicidade, enquanto concentrações sub-terapêuticas são ineficazes e podem levar a resistência ao fármaco. Fonte: BIZERRA *et al.*, 2016.

Nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, nanocristais, ciclodextrinas, dendrímeros, nanotubos de carbono, micelas poliméricas são as principais nanoestruturas utilizadas como sistemas de liberação de fármacos (MARCATO; DURÁN, 2008; POLETTO *et al.*, 2008). No entanto, a eficácia da nanoestrutura como veiculadora depende do tamanho, forma e outras características biofísicas.

A exemplo do uso de nanopartículas para liberação controlada, a quitosana que é um biopolímero, apresenta atividade muco adesivas e pode ser usado na introdução nas junções epiteliais estreitas, sendo usadas conjugadas a alguns tipos de fármacos, pode ser usado em tecido bucal, intestinal, nasal, dentre outros (ARTURSSON *et al.*, 1994; FERNÁNDEZ-URRUSUNO *et al.*, 1999; PORTERO *et al.*, 2002). Lee e colaboradores (2011), revestiu nanopartículas de ferro em ácido oleico, encapsulada em quitosana conjugada com ácido oléico, com o intuito de analisar a acreção dessas partículas em células tumorais por meio de penetração e retenção para uso analítico pelos mecanismos de imagem por infravermelho e ressonância magnética.

### **1.2.3. Nanopartículas metálicas**

As nanopartículas metálicas são sistemas nanoestruturados que apresentam características físico-química-biológica, dependente de sua composição, tamanho e forma e podem se destacar pela entrega e liberação de drogas, insumos agropecuários e cosméticos; pela elaboração de sensores para diagnosticar doenças, infecções e contaminações; produção de nanopartículas superparamagnéticas para bioseparação seletiva e magnetodiálise, dentre outros usos (RESENDE, 2017).

O uso de nanopartículas magnéticas vem permitindo avanços significativos em tecnologias para aplicação na biomedicina. Para seu uso na área biomédica, nanopartículas magnéticas devem apresentar a característica de atravessar a barreira endotelial e se acumular na célula alvo. Para isto, podem ser recobertas com um material biologicamente ativo e deve haver o controle de seus parâmetros físicos. Além disso, as possibilidades do seu uso aumentam quando estas são recobertas com íons específicos, nucleotídeos, oligonucleotídeos, peptídeos, vitaminas, antibióticos e substratos análogos ou anticorpos (FATIMA *et al.*, 1997).

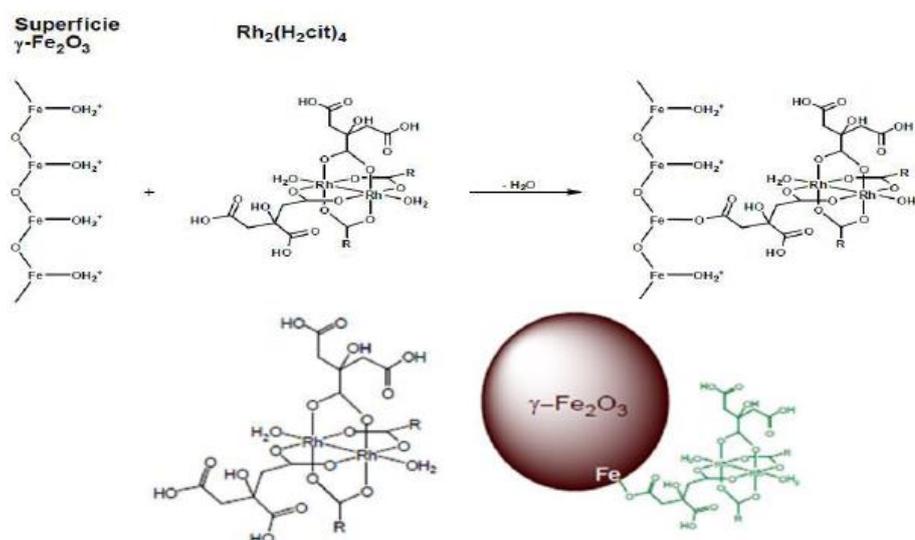
Em aplicações biomédicas, nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético podem ser aquecidas através de um campo magnético, levando essas nanopartículas a

elevarem a sua temperatura e consequentemente a do tecido tumoral, destruindo assim as células patológicas em ensaios *in vivo* (KIM *et al.*, 2006). Estas também podem ser aplicadas para aumento de contraste de imagem e obtenção de melhores imagens entre os tecidos doentes e normais, através de técnica de imagem por ressonância magnética nuclear (RMN) (TARTAJ *et al.*, 2003), isso acontece graças a sua característica de espelhamento da luz (HU *et al.*, 2011).

#### 1.2.4. Nanopartícula de Maghemita associado a Citrato de ródio

A maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) é um tipo de nanopartícula de óxido de ferro com potenciais aplicações para biológicas visto que apresenta excelentes propriedades magnéticas e, além disso, são pouco tóxicas. Estas são ferritas insolúveis em água e apresentam propriedades magnéticas que, ao serem associadas a outras drogas, podem ser direcionadas a uma célula alvo (FALQUEIRO, 2012).

A molécula de citrato de ródio apresenta em sua estrutura grupos funcionais de ácidos carboxílicos (-COOH) e hidroxilas (-OH) que são semelhantes a moléculas utilizadas para funcionalizar nanopartículas magnéticas. Desta forma, a funcionalização de nanopartículas de maghemita com citrato de ródio pode promover suspensões coloidais estáveis e biocompatíveis por conter grupos funcionais (citrato) apropriados para interagir com nanopartículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (CARNEIRO *et al.*, 2011, NUNES *et al.*, 2013) (**Figura 8**).



**Figura 8 - Esquema de associação química de uma nanopartícula de maghemita com uma molécula de citrato de ródio (II).** Fonte: CARNEIRO, 2011; NUNES, *et al.* 2013.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado os efeitos antitumorais e a toxicidade do citrato de ródio livre (CR) e associado a nanopartículas de maghemita (MRC), sendo demonstrado que ambos induziram efeito citotóxico e antitumoral em células de carcinoma mamário, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*. Ainda, MRC induziu maior citotoxicidade em células de carcinoma mamário do que em células não tumorais, bem como apresentou uma eficiência citotóxica cerca de cinco vezes maior em relação ao complexo livre. Ainda, foi demonstrado que a citotoxicidade destes compostos está associada a indução de estresse oxidativo, liberação de citocromo “c” da mitocôndria, fragmentação nuclear, exposição de fosfatidilserina, alterações estruturais na actina, condensação mitocondrial, modulação de expressão e síntese de fibronectina e laminina e aumento da quantidade de vacúolos (CARNEIRO *et al.*, 2011; PEIXOTO, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2015; SIQUEIRA, 2016; ROCHA *et al.*, 2017).

Alterações estruturais como a despolimerização da actina é mediada por uma variedade de proteínas que regulam sinais para apoptose e metástase (JORDAN & WILSON, 1998; GARDINER *et al.*, 2013), o que a torna um importante alvo terapêutico. Em estudo anterior, observamos alterações no citoesqueleto de actina após o tratamento com CR em MCF-7 (CARNEIRO *et al.*, 2011). Contudo, não avaliamos se esta alteração ocorreu em virtude da modulação gênica e/ou síntese da actina ou devido a regulação de tais processos. Sabe-se que a despolarização da actina também está associada à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) que, por sua vez, ocasiona abertura dos canais iônicos na mitocôndria e consequente despolarização da sua membrana e indução de apoptose (XU *et al.*, 2001; CHUNG *et al.*, 2009). Ainda, a apoptose pode ser desencadeada a partir de danos no DNA devido à formação de ROS e subsequente modulação de proteínas pró-apoptóticas como p53 ou anti-apoptóticas como Bax (CHEN *et al.*, 2001; SILVA & JASIULIONIS, 2014).

### **1.3. MORTE CELULAR**

#### **1.3.1 - Ciclo celular e Apoptose**

Durante a progressão da proliferação celular as células passam por quatro fases sequenciais: G1, no qual ocorre a síntese de proteínas envolvidas na maquinaria de duplicação do DNA (proteínas, enzimas e RNA); S, onde ocorre a replicação das moléculas de DNA; G2, em que acontece a síntese de proteínas para o processo de divisão

celular e fase M, em que realiza-se a mitose ou divisão celular. Ainda, a célula pode voltar para a fase G0 chamada fase ou estado de quiescência (ALBERTS *et al.*, 2004).

Ao sofrer divisão celular, a célula vai entrar novamente no ciclo celular ativo ou voltará para a fase G0. Em razão desse mecanismo se repetir várias vezes, passando por diferentes fases, algum erro pode ser acarretado durante o processo de divisão. Por este motivo, o ciclo é dotado de pontos de controle chamados ou *checkpoints* em que se verifica se a célula atende a todos os requisitos possíveis para avançar no ciclo. Estes *checkpoints* ocorrem entre G1 e S e G2 e M e na mitose para identificação de possível erro no material genético antes dele ser replicado ou se há necessidade de reparo do material genético antes da mitose e erros na formação do fuso mitótico e adesão dos cinetócoros aos microtúbulos, respectivamente (ORIA; BRITO, 2016).

Então, eventos de reparo, duplicação e separação cromossômica regulam a progressão do ciclo através de uma variedade de proteínas que são chamadas de quinases dependentes de ciclinas (CdKs) que, em sua forma ativa, tem a capacidade de formar complexos com as ciclinas, e assim agem fosforilando proteínas específicas do ciclo. As ciclinas são sintetizadas somente em momentos particulares de cada fase variando assim, sua quantidade e tipo. Estas, ao se unirem formando o complexo ciclinas/Cdks, ocasionam a fosforilação da proteína retinoblastoma (PrB) que, em seu estado inicial ativo, se encontram hipofosforilada tendo a função de parar ou dar continuidade a progressão celular (ALBERTS, *et al.*, 2002; BRUGAROLAS, *et al.*, 1998; NICULESCU *et al.*, 1998; DIAS 2005).

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada a qual desencadeia uma série de alterações morfológicas e estruturais e é importante para a manutenção constante da população celular (JOHNSON, WALTER, 2012). São vários os fatores que podem acioná-la tais como infecção viral, radiação, toxinas, isquemia moderada, alterações metabólicas, fatores hormonais e depleção de fatores de crescimento (ORIA, BRITO, 2016). Durante a apoptose ocorre sinalização celular por diversas moléculas, por meio de um amplo mecanismo que pode ser iniciado pela via extrínseca ou intrínseca.

A via extrínseca é iniciada por meio de receptores de morte localizados na membrana plasmática enquanto que a via intrínseca é ativada por estímulos citoplasmáticos, ou seja, por estímulos internos, tais como lesão do DNA ou perturbações no ciclo celular. Cada uma destas vias resulta na ativação de uma cascata de caspases iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e posteriormente efetoras (caspases 3 e 6), enzimas que desempenham papel fundamental no processo de morte. Genes como p53, Bcl-2, Bax,

p16, p15, p19, p21, p27 e p57 estão envolvidos no processo de apoptose desempenhando papéis críticos na regulação desse tipo de morte celular programada (KUMAR, 2007; LAMKANFI *et al.*, 2007).

## **1.4. ESTRESSE OXIDATIVO**

### **1.4.1. Espécies reativas de oxigênio**

Segundo Machado e colaboradores (2009), durante o metabolismo celular pode ocorrer a oxidação de moléculas biológicas quando acontecem em excesso ou em momentos inadequados. Normalmente, nosso organismo possui um complexo sistema de moléculas que neutraliza o efeito de oxidação de moléculas biológicas e que atuam, assim, como antioxidantes.

Radicais livres são denominados como espécies reativas de oxigênio (EROs) e representam moléculas em que o elétron se encontra desemparelhados no centro do átomo do oxigênio. EROS são geradas no nosso organismo com finalidades biológicas importantes tais como em mecanismos imunológicos (na proteção contra uma dada infecção), produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, e síntese de substâncias biológicas (BARBOSA *et al.*, 2010).

A sinalização REDOX, aquelas envolvidas em reações de troca de elétrons por meio de redução e oxidação de moléculas biológicas tem uma ocorrência natural na célula. Um exemplo é a produção de  $O_2^-$  que é produzido quando o oxigênio ( $O_2$ ) é metabolizado pela mitocôndria por meio da cadeia transportador de elétrons (VALKO *et al.*, 2007).

Geralmente, a produção de ROS encontra-se elevada em lesões teciduais causadas por traumas ou infecções, por radiações, hipóxia, toxinas e por exercícios extremos. Isso acontece em decorrência do aumento de enzimas envolvidas na formação destes radicais e também da ativação de fagocitose, da liberação de ferro e cobre ou a partir de uma interrupção da cadeia transportadora de elétrons (ROCK *et al.*, 1996).

Diversos componentes celulares estão suscetíveis a ação de ROS os quais podem ocasionar alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares. Isso decorre de um processo chamado de peroxidação lipídica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). ROS podem atuar em várias etapas do da carcinogênese estando envolvidos na iniciação e progressão do câncer (MØLLER; WALLIN, 1998). Porém espécies reativas de

oxigênio são consideradas como facas de dois gumes, pois também podem tornar as células cancerosas mais sensíveis a morte celular do que células saudáveis, induzida pelo estresse oxidativo (TRACHOOTHAM *et al.*, 2006).

Em células epiteliais o peróxido de hidrogênio, uma molécula considerada como EROS, induz a apoptose celular (HOSSAIN, *et al.*, 2010). Altos níveis de EROS têm a capacidade de causar várias lesões aos constituintes moleculares, como nos materiais genéticos e pode levar a peroxidação dos lipídios da membrana (LEONARDUZZI *et al.*, 2010; SVILAR *et al.*, 2010; MAGDER *et al.*, 2006)

Segundo Gouveia e colaboradores (2017), EROS podem ser desativadas ou estabilizadas com o uso de moléculas antioxidantes. Estas podem atuar por diversos mecanismos como na inibição de enzimas que levem a formação de radicais livres ou na captura e regeneração de radicais livres, dentre outros. A exemplo destas enzimas podemos citar a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a desmutação de  $O_2$  convertendo-o em  $H_2O_2$ , que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas; a Catalase (CAT) que catalisa água e oxigênio para formação de  $H_2O_2$ ; Glutona Peroxidase (GSH-Px) que catalisa a redução de  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos para o seu álcool correspondente. Todas estas enzimas reagem por meio de ciclos entre a sua forma oxidada e sua forma reduzida (OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010).

## **1.5. microRNA'S DE INTERFERÊNCIA**

### **1.5.1. microRNA**

Ambros e colaboradores (1993) relataram durante o estudo de um nematóide (*Caenorhabditis elegans*) a presença de uma pequena fita de RNA com apenas 22 pares de bases nitrogenadas que, curiosamente, não codificava qualquer proteína. Descobriu-se, porém, que esse RNA curto exercia um importante papel no controle pós-transcricional de RNA mensageiro, o qual era decisivo no desenvolvimento desse animal. Futuramente, este RNA curto passou a ser denominado de microRNA (miRNA).

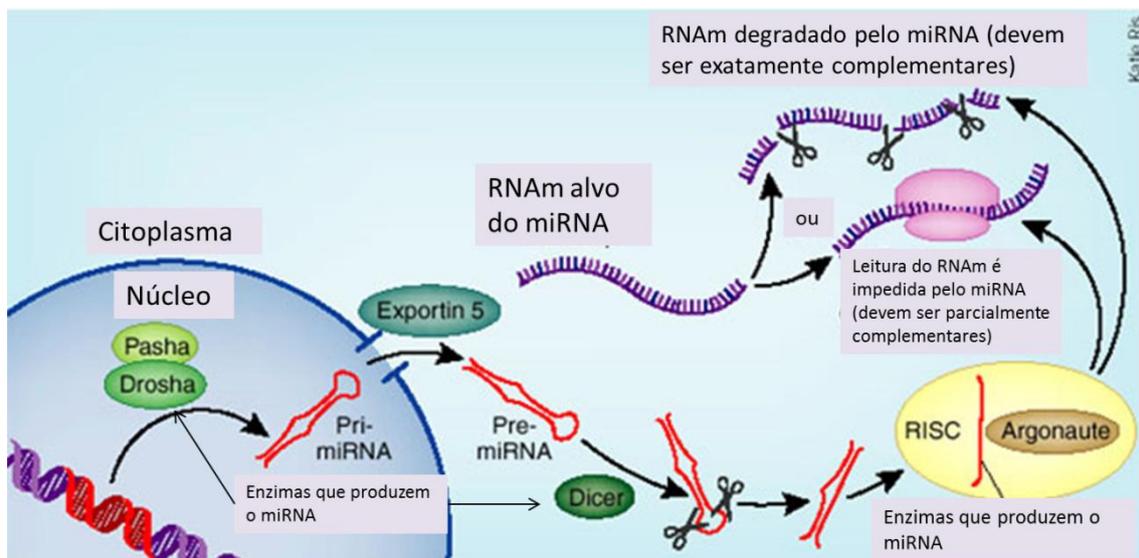
Os miRNAs são RNAs curtos não-codantes, com cerca de 20 nucleotídeos, os quais regulam a expressão de genes alvos em nível pós-transcricional impedindo a tradução do mRNA e favorecendo a sua degradação. Por isso, estes RNAs curtos possuem uma elevada potencialidade terapêutica e seu uso se tornou importante nos estudos de RNA de interferência (RNAi) (FIRE *et al.*, 1998; CARTHEW & SONTHEIMER, 2009;

BURNETT & ROSSI, 2012). Estima-se que haja mais de 1.000 miRNAs em seres humanos e, destes, já foi identificado 462 miRNAs (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006)

Geralmente, a disfunção da expressão de miRNA's no tumor está associada a regulação de genes-alvo relacionados tanto com a transformação oncogênica como na supressão tumoral. Portanto, o emprego de oligonucleotídeos sintéticos exógenos, que mimetizem miRNA supressores de tumor ou inibidores de oncogenes, poderia ser utilizado estrategicamente visando tratamento de câncer (IORIO *et al.*, 2011; KRELL *et al.*, 2012; LIU, 2012; BOLOGNIA *et al.*, 2015). Neste contexto, estratégias experimentais permitem modificar o conteúdo de determinado miRNA de acordo com o objetivo.

### 1.5.2 - Biogênese do MicroRNA (miRNA)

Uma longa fita de miRNA (pri-miRNA) surge a partir da transcrição de um gene alvo pela RNA polimerase (**Figura 9**). Este pri-miRNA tem uma estrutura de *hairpin* que é clivada pela RNase III, Drosha e seu cofator DGCR8, ainda no núcleo, gerando o pré-miRNA (LEE *et al.*, 2003, 2004). A exportina 5 tem a função de transportar essa fita de pre-miRNA do núcleo para o citoplasma, onde a enzima Dicer (endonuclease de RNase III) irá clivar a dupla fita liberando assim um miRNA de 22 nucleotídeos de fita dupla (GREGORY; SHIEKHATTAR, 2005). Esta fita então será agregada ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) juntamente com as proteínas argonautas onde permanecerá nesse complexo para controlar a expressão pós-transcricional de um gene alvo (SCHWARZ *et al.*, 2003; ESQUELA-KERSCHER *et al.*, 2006).



**Figura 9- Biogênese ou geração do microRNA e o mecanismo de inibição de síntese proteica.** Pri miRNA é formado no núcleo da célula onde este se une a uma proteína de transporte sendo levada para o citoplasma, onde enzimas como a Dicer, RISC e Argonauta, irão produzir o miRNA, que terá a função de degradar um RNAm. Fonte: site [http://nanocell.org.br/wp-content/uploads/2013/10/biogênese\\_rna.jpg](http://nanocell.org.br/wp-content/uploads/2013/10/biogênese_rna.jpg).

A relação entre o câncer e miRNA foi evidenciado por Calin (2002) onde este descreveu que dois genes, o mir-15 e mir-16, estão localizados em uma região do cromossomo 13 que está deletada em grande parte em pacientes com leucemia linfocítica crônica (LCC). A ligação foi reforçada com a descoberta que o número de genes de miRNA estão localizadas em locais frágeis que são regiões instáveis associadas com a promoção do desequilíbrio no DNA de células cancerosas (CALIN *et al.*, 2004).

Estudos de perfil de expressão de 15 miRNA's demonstraram distintos padrões destes entre células tumorais e saudáveis. Com isso, foi possível associar estes padrões com características histopatológicas relacionados a capacidade de proliferação e migração vascular tumoral (IORIO *et al.*, 2005). Também foi descoberto que a superexpressão dos microRNA's mir-335, mir-126 e mir-206 em células metastáticas causa a redução da doença no pulmão e ossos. Considerando esse efeito, observou que a redução do mir-355 e mir 126 para tumores primários diminui a sobrevivência dos ratos (TAVAZOIE *et al.*, 2008).

O processo de RNAi pode ser mimetizado mediante o uso de moléculas curtas de RNA sintético (*mimics*) sendo que tais moléculas irão atuar de maneira semelhante aos miRNAs de ocorrência natural causando, assim, silenciamento gênico pós-transcricional (DAVIDSON & MCCRAY, 2011; POLTRONIERI *et al.*, 2013. Por outro lado, o uso de anti-miRs causa inibição da atividade de determinado miRNA. Em ambos os casos se

tratam de oligonucleotídeos sintéticos complementares à sequência do miRNA-alvo que, desta forma, irão inibir a sua função biológica (KRUTZFELDT *et al.*, 2005). (KRÜTZFELDT *et al.*, 2005)

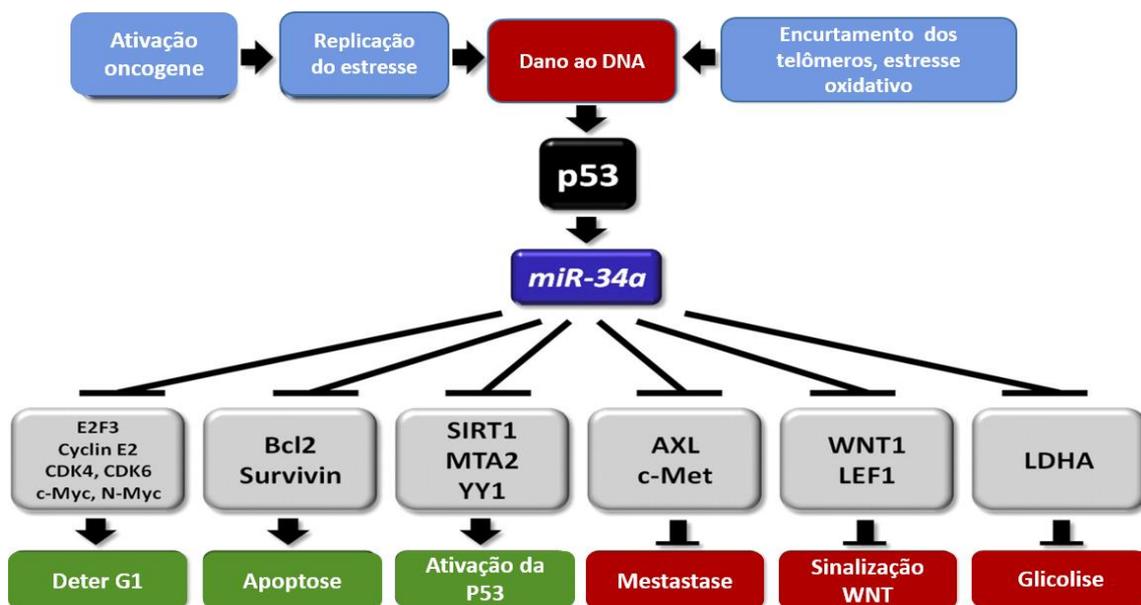
Ademais, os microRNA's podem atuar como reguladores de fatores anti-apoptóticos como o mir-15 e mir-16 na regulação da proteína antiapoptótica Bcl-2. Esta relação foi comprovada ao se observar que o uso do desses microRNA's provoca apoptose em cultura de células de linfoma de Hodgkin. Na literatura é descrita alteração genética de Bcl-2 nesta doença mostrando, assim, a importância da modulação desse microRNAs na evasão da apoptose e modulação da tumorigênese (KREK *et al.*, 2005).

Dentre vários miRNAs de interesse na oncologia o mir-34a e mir-7 destacam-se em virtude de seus diversos efeitos biológicos. Por exemplo, mir-7 está envolvido nos processos de proliferação e migração celular, regulando diferentes genes alvo (ZHAO *et al.*, 2015). Por outro lado, mir-34a está relacionado com a síntese de p53 e subsequente indução de estresse oxidativo e apoptose (CHO, 2011; MISSO *et al.*, 2014).

### **1.5.3. Mir-34a**

O mir-34a, mir-34b e mir-34c são membros da família mir-34 e são codificados por diferentes genes. O mir-34a é codificado no cromossomo 1 enquanto o mir-34b e mir-34c são codificados no cromossomo 11 (LI *et al.*, 2014). Este miRNA, o mir-34a, está presente em todas as células de tecidos humanos normais (SLABAKOVA *et al.*, 2017).

O mir-34a é um supressor de tumor que atua em vários tipos de câncer através da supressão de vários alvos experimentalmente validados (**Figura 10**) (CHEN; HU, 2012; DE ANTONELLIS *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011).



**Figura 10 - Alvos do miR-34a confirmados experimentalmente.** O dano ao DNA pode ocorrer por uma série de eventos que levam a expressão da proteína p53, esta proteína irá modular positivamente os níveis do miR-34a, que tem a capacidade de inibir proteínas que irão levar a ativação da p53 e conseqüentemente ao processo de apoptose. Fonte: Adaptado de KALLER *et al.*, 2011.

Os níveis de expressão desse microRNA podem estar relacionados, ainda, com a produção de ROS. A produção de ROS pode levar expressão da proteína p53 que, por sua vez, induz parada no ciclo celular e posterior apoptose. Ainda, a p53 está envolvida no processamento do pré-microRNA e na transcrição direta de genes de microRNA para promoção do miR-34a. Isto leva ao silenciamento de algumas proteínas que, por fim, modulam a ativação de p53 novamente (VOUSDEN, K.H. *et al.*, 2002; LIU, B, *et al.*, 2008; SUZUKI, H *et al.*, 2009).

MicroRNA's específicos tem a capacidade de modular as espécies reativas de oxigênio (EROS) podendo sua produção ser inibida ou estimulada. Assim, o uso de antimir-34a inibiu a produção de ROS em células de glioma da linhagem A172 (LI, S.Z., 2014).

#### 4.4. Mir-7

O mir-7 é codificado por três lócus genômicos diferentes sendo o produto de três sequências diferentes de DNA. Muitos estudos relatam que o mir-7 está superexpresso em uma variedade de tecidos normais (KALINOWSKI *et al.*, 2014). Evidências mostram

que o mir-7 desempenha um papel importante no crescimento e migração celular (ZHAO *et al.*, 2015). Esse microRNA está envolvido na regulação da via de sinalização do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) (KALINOWSKI *et al.*, 2014).

Embora tenha sido relatado que o mir-7 esteja regulado negativamente em várias neoplasias malignas, incluindo câncer de mama, (RAI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014, 2013) níveis aumentados deste miRNA foram associados a agressividade do tumor (FOEKENS *et al.*, 2008). Diversos são os estudos que demonstram que a restauração terapêutica do mir-7 é capaz de sensibilizar as células cancerígenas aos tratamentos com posterior uso de quimioterápicos. A exemplo disso, podemos citar o uso do mir-7 que inibiu a proteína 1, associada a resistência de múltiplas drogas aumentando a sensibilidade no câncer de mama resistente ao uso de cisplatina (POGRIBNY *et al.*, 2010).

Assim, podemos afirmar que a reposição exógena de mir-7e mir-34a associado a quimioterápicos pode ser um interessante modelo para emprego na terapia do câncer. Diante dos casos onde há o surgimento da resistência de células cancerosas aos tipos de terapias já existentes, o estudo de novas terapias combinadas representa mais um passo na descoberta de novos tratamentos que usam de ferramentas biotecnológicas.

Neste estudo será avaliado o papel de miR-34a e miR-7 na indução de apoptose mediada por MRC em cultura de células de carcinoma mamário. Serão utilizados oligonucleotídeos sintéticos, denominados de *mimics* para avaliar a participação destes miRNAs nos fenótipos de duas linhagens de carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231). Ainda, será testada a eficácia da combinação terapêutica entre MRC e oligonucleotídeos sintéticos de miR-34a e miR-7. O objetivo do uso combinado de MRC e *mimics* de mir-34a e mir-7 foi avaliar se o efeito terapêutico de MRC seria potencializado em relação ao uso apenas com MRC em células de adenocarcinoma mamário.

## 2. JUSTIFICATIVA

Sendo o câncer de mama o segundo de maior incidência no mundo e no Brasil, faz-se necessário estudos para a descobertas de estratégias terapêuticas mais eficazes. A quimiorresistência ao tratamento está relacionada a fatores intrínsecos associados a mutações em células que levam à ativação de vias compensatórias, tornando a célula tumoral não responsiva ao tratamento (HOLOHAN *et al.*, 2013).

O uso de terapias combinadas pode favorecer uma melhor resposta terapêutica, pois visa o aumento da sensibilização de células alvo ao tratamento. Desta forma, terapias que visem mais de um mecanismo de ação podem representar uma promissora estratégia para aumentar a eficácia terapêutica especialmente de células que apresentam quimiorresistência.

Citrato de ródio livre (CR) e associado à nanopartículas de maghemita (MRC) foi avaliado em estudos *in vitro* e *in vivo* e induziu significativa atividade citotóxica e citostática em células de carcinoma mamário. Além disso, estas formulações atividade antitumoral em camundongos em portadores de carcinoma mamário (CARNEIRO *et al.*, 2011, CARNEIRO *et al.*, 2013; PEIXOTO *et al.*, 2014; CARNEIRO *et al.*, 2015). Ainda, o efeito citotóxico destas formulações tem sido relacionado com a capacidade de induzir estresse oxidativo e fragmentação do DNA (CHAVES *et al.*, 2015).

O uso de microRNAs em terapias combinadas com quimioterapia tem sido relatado promissor. O mir-34a é codificado por um gene específico e está presente nos tecidos humanos, com a função de silenciamento pós transcricional. Ele já foi confirmado através de estudos como sendo um miRNA supressor de tumor (CHEN; HU, 2012; DE ANTONELLIS *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011). Em especial, mir-34a induziu a sensibilização à quimioterápicos como doxorrubicina, cisplatina e paclitaxel em algumas linhagens celulares de câncer de mama (WU *et al.*, 2014).

Neste estudo foi avaliado se a reposição de mir-34a combinada com o tratamento com citrato de ródio associado a nanopartícula de maghemita induzia alterações na viabilidade e morfologia celular, na produção de espécies reativas de oxigênio e indução de apoptose. A hipótese é de que a terapia combinada (quimioterapia e terapia gênica) poderia levar a uma sensibilização das células de carcinoma mamário em relação às terapias isoladas (quimioterapia ou terapia gênica).

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral**

Avaliar o potencial terapêutico de miméticos de mir-34a e mir-7 (*mimics*) como tratamento adjuvante à terapia de CR e MRC em cultura de células de carcinoma mamário.

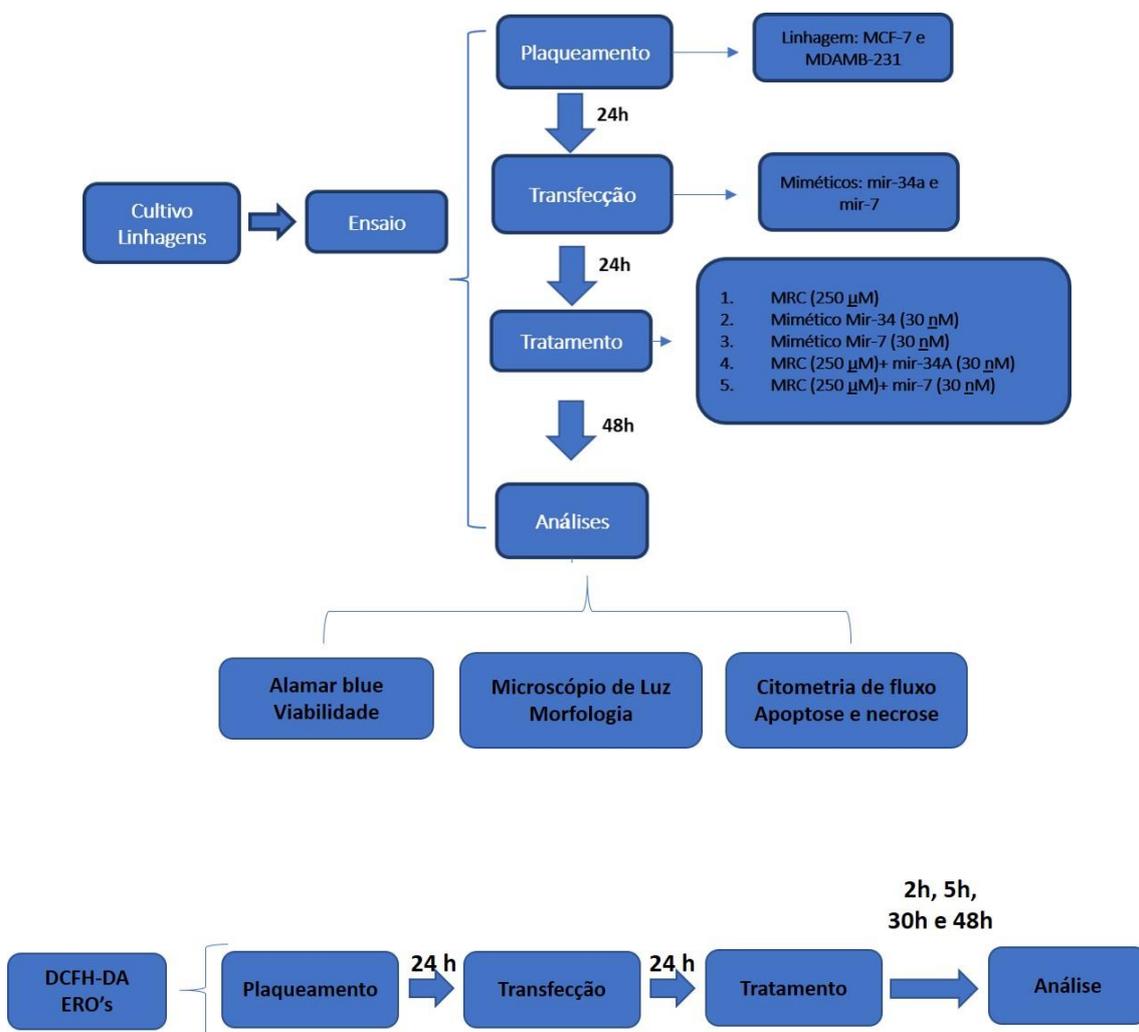
#### **Objetivos específicos**

Avaliar em cultura de células de carcinoma mamário se os tratamentos:

- 1) reduzem a viabilidade celular.
- 2) alteram a morfologia celular.
- 3) aumentam a produção de EROs.
- 4) induzem apoptose.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Para uma melhor compreensão do delineamento experimental, adotado neste estudo, segue o fluxograma abaixo (**Figura 11**).



**Figura 11 – Fluxograma experimental adotado nessa dissertação.** Delineamento experimental das linhagens celulares usada durante a dissertação, tipos de miméticos, concentração e grupos de doses e os tipos de análises que serão realizadas.

Neste estudo foi investigada o potencial terapêutico do uso combinado de MRC e de miméticos de mir-34a e mir-7 em células das linhagens de câncer de mama: MCF-7 e MDA-MB-231. Primeiramente, para avaliação de citotoxicidade foi usado um método que avalia atividade metabólica celular com o reagente *alamar blue* (resazurina). A

morfologia das células foi analisada por meio de microscopia óptica comum. Ainda, para avaliar o efeito dos tratamentos na produção de espécies reativas de oxigênio utilizou-se o reagente DCFH (2',7'-Diacetato de diclorofluoresceína) e analisou-se os dados em espectrofotômetro. Também foram realizadas análises para verificar o tipo de morte celular induzida pelos tratamentos por meio de técnica de citometria de fluxo utilizando os marcadores anexina-V FITC (Flouresceína-5-isotiocianato) e PI (iodeto de propídio).

Os materiais utilizados neste estudo estão listados na Tabela 01.

**Tabela 01- Lista de materiais utilizados para os experimentos**

<b>Materiais</b>	<b>Fabricantes</b>
<b>Alamar Blue</b>	Invitrogen, EUA
<b>2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate</b>	Sigma, EUA
<b>Azul de tripan</b>	Sigma, EUA
<b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</b>	Gibco, EUA
<b>Etanol</b>	J.T. Backer, Brasil
<b>Iodeto de Propídeo</b>	Invitrogen, EUA
<b>Soro Fetal Bovino (SFB)</b>	Gibco, EUA
<b>Tampão fosfato salina (PBS)</b>	Laboreclin, EUA
<b>Tripsina</b>	Gibco, EUA
<b>Anexin V</b>	Invitrogen, EUA
<b>INTERFERin</b>	Polyplus, EUA
<b>L15</b>	Gibco, EUA
<b>Mimics mir-34a</b>	Exiqon, EUA
<b>Mimics mir-7</b>	Exiqon, EUA
<b>HEPES</b>	Sigma, EUA
<b>NaCl</b>	Sigma, EUA
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Sigma, EUA

#### **4.1. Cultivo celular**

Foram utilizadas duas linhagens celulares de carcinoma mamário humano (MCF-7 e MDA-MB-231). Células da linhagem MCF-7 foram cultivadas em meio de cultura

*Dulbecos's modified Eagle's Medium* (DMEM) e a linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em meio Leibovitz - L-15 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% penicilina/estreptomicina.

As duas linhagens celulares foram mantidas em frascos de cultura (totalmente fechados para a linhagem MDA-MB-231) com os meios de cultivo descritos acima e foram mantidas em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A visualização da taxa de crescimento foi feita por meio de análise em microscópio óptico invertido (AxioVert. Al, Zeiss).

Após as células adquirirem confluência de mais de 70% realizava-se as passagens (repiques) das células. Para isso, as células eram lavadas com solução *Phosphate-Buffered Saline* (PBS 1x, GIBCO) e depois submetidas à ação proteolítica de solução de tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (GIBCO) e incubadas entre três a sete minutos a 37°C. A seguir, a ação enzimática era neutralizada com meio de cultivo e o meio em suspensão formado era homogeneizado. Deste meio, uma alíquota era usada para a quantificação do número de células para os experimentos por meio de contagem direta em Câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão por corante Azul de Tripán (GIBCO).

## **4.2. Tratamento das células**

### **4.2.1 Quimioterapia com CR e MRC**

As células foram semeadas em placas de 96 ou 12 poços, conforme cada ensaio, e incubadas por 48 horas com as seguintes soluções de tratamento: (1) citrato de ródio livre (CR, 50 a 300 µM); (2) citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita (MRC, 50 a 300 µM) e (3) nanopartículas de maghemita com citrato (MC, dose equimolar de ferro em relação a MRC na dose de 300 µM).

Foram incluídos nos ensaios um grupo constituído por células não tratadas (CN, controle negativo) e outro grupo como controle positivo em que se utilizou paclitaxel na dose de 50 nM. Para os grupos de tratamentos com CR e MRC foram utilizadas doses equimolares de ferro e de número de partículas (0,65 a 2,6 mM e 1,4 a 1,6 x 10<sup>15</sup> NP/mL) correspondentes às mesmas encontradas na dose de 300 µM de MRC. As formulações CR e MRC foram sintetizadas na Universidade Federal de Goiás (UFG), sob a

responsabilidade do prof. Dr. Aparecido Ribeiro de Souza, de acordo com o protocolo descrito por Carneiro *et al.*, (2011).

As formulações foram diluídas em água, assim foram testadas se esta quantidade de diluente existente causava algum tipo de injúria nas células, tendo como resultado um efeito inerte ou a quantidade de água existente não causou injúria as células.

#### **4.2.2 Transfecção com oligonucleotídeos sintéticos para miR-34 e miR-7**

As células foram semeadas em placas de poliestireno e, após 24 horas, foram transfectadas com oligonucleotídeos sintéticos direcionados a mir-34a e mir-7 (*mimics*) na dose de 30  $\mu$ M. Estes *mimics* (Exiqon) foram preparados na forma de oligonucleotídeos LNA (locked nucleic acid), fosforotioados (Exiqon). Também foi utilizado um controle negativo denominado *scramble* que trata de uma sequência de oligonucleotídeos esdrúxula e este foi considerado como um controle interno para descartarmos a possibilidade de resultados falso positivos, visto que ele não deveria induzir efeitos citotóxicos tampouco alterações nas células relacionadas aos miméticos de miRNAs.

Para realizar-se a transfecção dos microRNAs, nas células, foi feita uma solução de transfecção contendo 0,5  $\mu$ l de interferin, 50  $\mu$ l de meio de cultura sem soro e *mimics* de mir-34a e mir-7 na concentração de 30 nM. Esses volumes foram considerados para cada poço da placa de poliestireno de 96 poços, sendo o volume final de 175  $\mu$ l em cada poço.

As soluções de transfecção foram homogeneizadas primeiramente sob movimentos manuais de cima para baixo e depois que se adicionou os *mimics* alvos as soluções foram homogeneizadas em vórtex por dez segundos e aguardou-se dez minutos para a formação do complexo de transfecção antes de adicioná-lo às células. Enquanto isso, o meio de cultura foi substituído por 125  $\mu$ l de meio completo (DMEM ou Leibovitz - L15, suplementados com 10% de SFB e 1% penicilina/estreptomicina) pré-aquecido em temperatura ambiente 37°C.

Em seguida, adicionou-se 50  $\mu$ l da solução de transfecção e a placa foi agitada suavemente por meio de movimentos manuais para que os miméticos ficassem distribuídos uniformemente. Nos poços do grupo não transfectados (controle negativo e MRC a 250  $\mu$ M) adicionou-se apenas 50  $\mu$ l de meio de cultura DMEM se for para linhagem MCF-7 ou Leibovitz - L15 para linhagem MDA-MB-231, sem soro fetal

bovino. Em seguida, as células foram mantidas em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até o momento do tratamento.

#### **4.3 Determinação de viabilidade celular por *Alamar blue***

A análise da viabilidade celular foi realizada utilizando-se ensaio fluorimétrico por meio do reagente *alamar blue* (resazurina). Neste ensaio foram semeadas 5 x 10<sup>3</sup> células por poço de ambas as linhagens (MDA-MB-231 e MCF-7) em placas de 96 poços. Após 24 h, as células foram transfectadas e aguardou-se mais 24 horas para proceder-se aos tratamentos conforme item 3.2.1. Seguidas 48 horas, o meio de cultura foi retirado e os poços, contendo as células, foram lavados suavemente com solução salina de fosfato (PBS) para retirar o excesso de nanopartículas precipitadas no fundo dos poços da placa.

Após, adicionou-se 100 µl/poço de meio de cultura e acrescentou-se 10% de *alamar blue* em relação ao volume total de meio do poço, ou seja, 10 microlitros. Logo após as células foram incubadas por 2,5 h em incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C. Em seguida, as células foram analisadas em espectrofotômetro (Spectramax M3) em faixa de comprimento de onda de emissão a 570 nm e de excitação a 590 nm (MOSES; EDWARDS; BRANTLEY, 2016). Os dados obtidos de fluorescência foram transformados em porcentagem utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{média dos poços tratados/média dos poços controle}) \times 100$$

Para a normalização do ensaio, foram adicionados grupos em poços sem células que levavam somente meio e em outro grupo com meio e tratamento. Estes grupos seguiram o mesmo desenho experimental e foram avaliados ao final de cada ensaio.

#### **4.4 Análise de morfologia por microscopia óptica**

As células foram visualizadas na objetiva de 20 X e fotografadas em microscópio óptico comum (Axiovert, Zeiss), operado em contraste de fase, para observação das alterações morfológicas induzidas pelos tratamentos. Neste ensaio utilizou-se das placas sob análise descrita no item 3.4.

#### 4.5. Detecção de produção de EROs intracelular

Para este ensaio utilizou-se o reagente DCFH-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) (Sigma), este reagente é uma sonda não fluorescente permeável às células, este é desesterificado intracelularmente e se transforma em 2',7 – diclorofluoresceína que é altamente fluorescente após a oxidação. O reagente foi dissolvido em etanol de maneira a se obter uma solução estoque a 50 mM e, a partir desta, diluiu-se novamente para produção de uma solução de uso sob a concentração de 2 mM. Peróxido de hidrogênio (200 µM) foi utilizado como controle positivo aplicado no momento da leitura (SHARMA *et al.*, 2017).

Neste ensaio foram semeadas  $5 \times 10^3$  células por poço e as células foram tratadas de acordo com o item 3.2.1. Inicialmente, realizou-se ensaios com grupos controle negativo e positivo, mir-34a e MRC (250 µM) por duas, cinco e trinta e quatro e oito horas com o objetivo de observar se o perfil de produção de EROs era alterado com o tempo.

A leitura de cada de placa ocorreu, após 2h, 5h, 30h e 48 horas após o tratamento em intervalos de cinco minutos durante dez tempos diferentes.

#### 4.6. Análise de morte celular por meio de citometria de fluxo

A análise do tipo de morte induzida pelos tratamentos foi realizada por meio de marcação das células com anexina Fluoresceína-5-isotiocianato (Anexina V-FITC) e Iodeto de propídio (PI). Neste ensaio foram semeadas  $7 \times 10^4$  células em placas de 12 poços e após 24 h, as células foram tratadas conforme item 3.2.1. Decorrido 48 horas após o tratamento, tanto as células aderentes como as células em suspensão, foram lavadas com 200 µl de PBS, tripsinizadas com 100 µl e após cinco minutos inativadas com 200 µl meio de cultura, centrifugadas a 1800 RPM e o pellet de células foram ressuspensas em 100 µl de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub> – pH 7,4) contendo 3 µl de anexina-V. Logo, as células foram incubadas com esta solução por 15 minutos e mantidas em *ependorfs* em gelo, protegidas da luz.

Após este período, mais 400 µl do tampão de ligação da Anexina V foram adicionados aos tubos e 500 µl da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídio – 2 g/mL) foram adicionados posteriormente. As células foram incubadas por mais cinco minutos com esta solução em gelo e lavadas com PBS. A aquisição dos dados foi feita em

citômetro FACS (Fluorescence- activated cell sorting) Calibur (Becton Dickinson). A análise dos dados foi realizada por meio do software CellQuest-Pro. As análises foram feitas a partir de dois experimentos independentes, onde em cada ensaio foram examinadas 10.000 eventos em cada grupo (GUIDO, 2014).

#### **4.7. Análise estatística**

Para analisar possíveis diferenças na viabilidade das células entre os tratamentos com CR e MRC em diferentes ensaios, realizou-se, inicialmente, um teste de repetibilidade para averiguar o índice de correlação intraclassa (ICC) foi aplicado, assumindo um resultado de boa repetibilidade ( $ICC \geq 0,9$ ). A correlação do ICC foi avaliada no software (Statistical Product and Service Solutions) SPSS Statistics. As variáveis foram testadas através do teste de Shapiro Wilk, avaliando assim a normalidade dos dados coletados.

Os valores da concentração inibitória 50 ( $IC_{50}$ ) para as células MCF-7 e MDAMB-231 foram calculados com base nos resultados obtidos pelo teste de viabilidade celular por Alamar blue com o tratamento das células por 48h. Para tal, a porcentagem de células viáveis foi plotada contra a dose de tratamento em escala logarítmica. O cálculo foi feito utilizando-se o *Software GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Para comparações entre o controle (sem tratamento) e tratamentos com foi aplicada uma análise de variância (ANOVA one-way) e pós teste multicomparativo de Tukey. Nos ensaios de avaliação da produção de EROs e nos ensaios de tipo de morte celular foi aplicado ANOVA *Two-way* seguido de pós-teste de Dunnet, todos os testes foram aplicados com o uso do *Software GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O nível de significância mínimo foi de  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

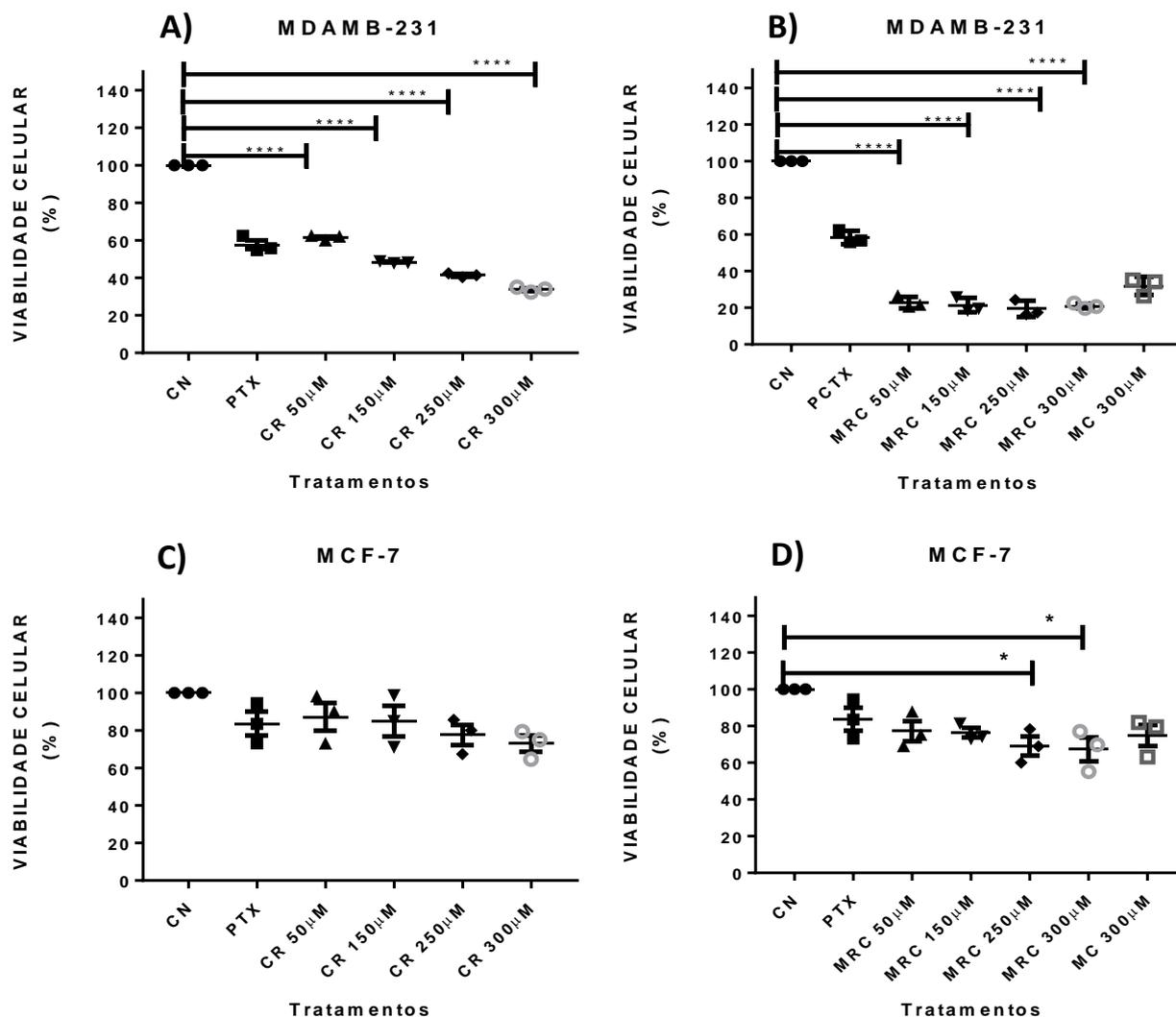
### 6.1. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

#### 6.1.1. Triagem de doses de CR e MRC

Primeiramente avaliou-se os possíveis efeitos de MRC (citrato de ródio associado a nanopartícula com maghemita) e de CR (citrato de ródio) em células das linhagens de adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231 e MCF-7) por meio de ensaio fluorimétrico com *alamar blue* (resazurina). O intuito deste ensaio foi confirmar a dose ideal em que o CR associado a nanopartículas de maghemita teria um efeito potencializado em relação ao complexo.

De uma forma geral, observou-se diferença significativa entre a viabilidade de células não tratadas (controle) e tratadas com CR e MRC. Em ambas as linhagens se notou que os tratamentos com MRC reduziram a viabilidade com maior intensidade do que os tratamentos com CR nas linhagens de células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 e MDA-MB-231 para as doses de 50 a 250  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ). Além disso, observou-se um efeito citotóxico diferenciado entre as linhagens, sendo que este efeito ocorreu com maior intensidade na linhagem celular MDA-MB-231. Sobretudo, o efeito citotóxico de MRC foi maior nas doses de 300  $\mu\text{M}$  em ambas as linhagens. Quando comparadas as duas linhagens não se observou diferença significativa nas doses entre 250  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$  (**Figura 12**).

Em relação a linhagem MDA-MB-231 se observou que os tratamentos com MRC e CR foram citotóxicos em todas as doses investigadas (**Figura 12**). Verificou-se que houve 62,2% ( $\pm 0,2$ ); 48,6% ( $\pm 0,4$ ); 41,9% ( $\pm 0,5$ ) e 33,7% ( $\pm 1,3$ ) de células viáveis após os tratamentos com CR (**Figura 12 A**) e 23,5% ( $\pm 3$ ), 22,2% ( $\pm 3,6$ ), 20,9% ( $\pm 3,4$ ) e 21,6% ( $\pm 0,9$ ) nos tratamentos com MRC (**Figura 14 B**) nas doses de 50, 150, 250 e 300  $\mu\text{M}$  para ambos tratamentos, respectivamente. Em relação a linhagem MCF-7 observou-se 69,1% ( $\pm 5,2$ ) e 67,4% ( $\pm 6,4$ ) de células viáveis nas doses de 250  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$  (**Figura 12 D**) para linhagem MCF-7.



**Figura 12 - Efeito dos tratamentos com Citrato de Ródio livre (CR) e associado a nanopartículas de Maghemita (MRC) sob a viabilidade de células de adenocarcinoma mamário das linhagens MDA-MB-231 (A e B) e MCF-7 (C e D) após 48 h.** O número de células viáveis nos tratamentos com 50  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 250  $\mu$ M e 300  $\mu$ M de MCR foi menor em relação ao controle (células sem tratamento) nas duas linhagens celulares investigadas. Todos os dados foram normalizados com o controle e expressos como média  $\pm$  erro do desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicatas submetidos a análise de variância *one-way* (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey e as análises foram feitas no programa *GraphPad* (versão 7.0). Asteriscos indicam diferença estatística em relação a controle negativo e tratamentos ( $p < 0.05$ ).

A partir dos dados obtidos nestes ensaios os valores de  $IC_{50}$  ( $\mu$ M) para a linhagem MDA-MB-231 no tratamento com MRC foram de 142,9  $\mu$ M com um intervalo de confiança muito longo e para linhagem MCF-7 foi de 211,3  $\mu$ M com um intervalo de confiança de 95% de 40,60 a 1100  $\mu$ M. Com isso, considerou-se a dose de 250  $\mu$ M para os ensaios descritos a seguir, uma vez que a maior dose de MRC investigada (300  $\mu$ M)

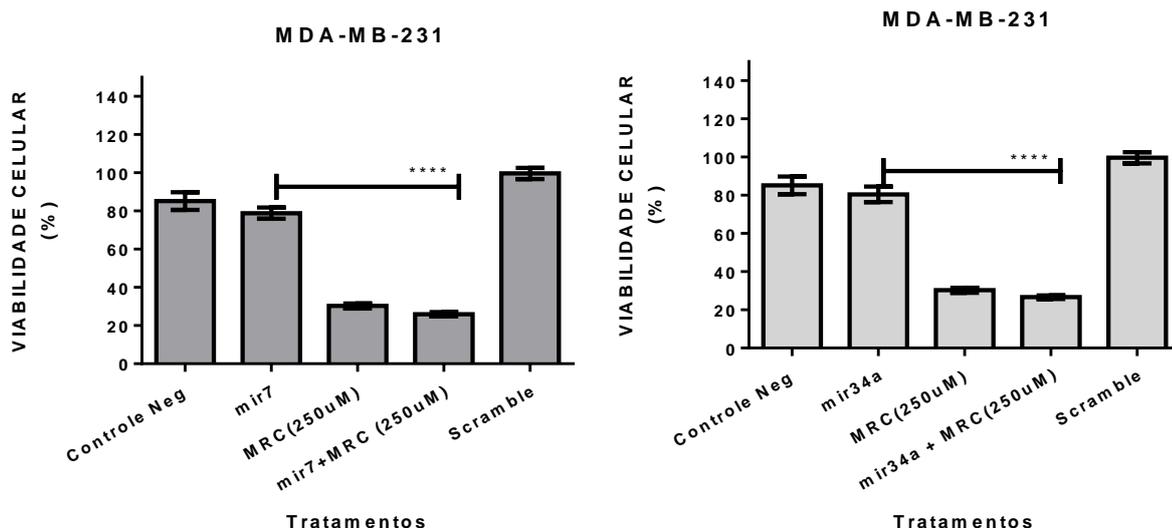
não fazia diferença significativa na redução da viabilidade celular em relação a dose de 250  $\mu$ M, em estudos anteriores a dose de 250  $\mu$ M em linhagens de câncer de mama, teve a capacidade de modular os níveis de actina da célula.

### 5.1.2 – Ensaios de interações terapêuticas entre microRNA's (mir-7 e mir-34a) e MRC

Neste ensaio avaliou-se o efeito citotóxico da reposição dos microRNAs mir-34a e mir-7 associados ao tratamento com MRC sob a viabilidade celular de MDA-MB-231 e MCF-7 após 48 horas. Esta avaliação foi feita por meio de ensaio fluorimétrico com *alamar blue* (resazurina). Por meio deste ensaio foi possível avaliar o efeito citotóxico induzido pelos microRNA's mir-34a e mir-7 associados ou não aos tratamentos com MRC (250  $\mu$ M).

Em geral, observou-se que os tratamentos com microRNAs, associados ou não a quimioterapia com MRC, reduziram a viabilidade celular em relação ao controle de células da linhagem MDA-MB-231. Contudo, notou-se que, quando foram realizados os tratamentos apenas com microRNAs, houve um menor efeito na redução da viabilidade celular do que quando estes foram associados a quimioterapia com MRC ( $p < 0.001$ ). Por outro lado, o tratamento apenas com MRC induziu citotoxicidade similar aos tratamentos com MRC associado a reposição dos microRNAs mir-7 e mir-34a. Células tratadas com o “*scramble*” (controle da transfecção) não sofreram mudanças na viabilidade quando comparada ao controle negativo (**Figura 13**).

Particularmente, observou-se que os tratamentos exclusivos com mir-7 e mir-34a tiveram a viabilidade celular de 78,9% ( $\pm 2,9$ ) e 80,5% ( $\pm 4$ ), respectivamente. Entretanto, MRC (dose de 250  $\mu$ M) induziu elevada citotoxicidade, em relação aos tratamentos exclusivos com microRNAs, visto que a viabilidade foi para 26%. Ademais, a associação da quimioterapia com MRC e reposição de mir-7 e mir-34a induziu toxicidade similar ao tratamento apenas com MRC (**Figura 13**).

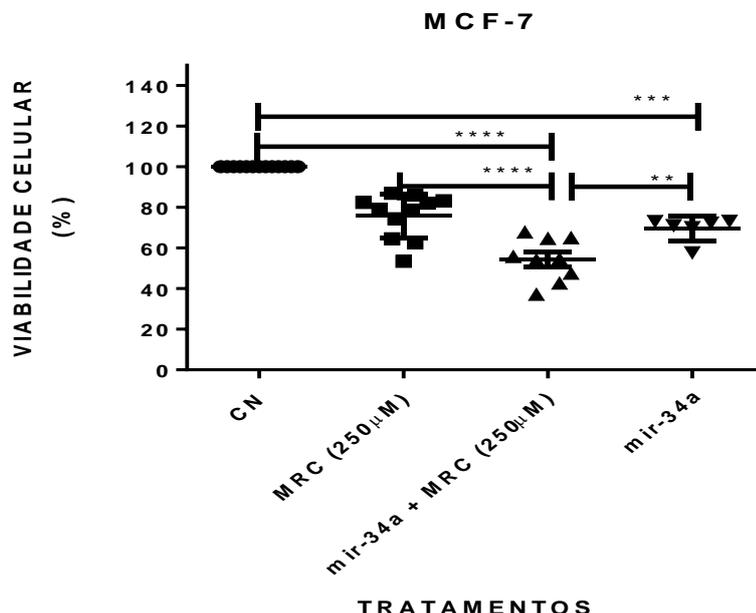


**Figura 13 - Efeito da reposição de mir-7 e mir-34a combinada com tratamento de Citrato de ródio associado a Nanopartículas de Maghemita (MRC) na viabilidade de células da linhagem MDA-MB-231 após 48 h.** O tratamento com MRC reduziu a viabilidade celular de forma similar aos tratamentos em que se empregou a reposição de microRNAs (mir-7 e mir-34a) combinada com a MRC. Todos os dados foram normalizados com o controle e expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média de dois ensaios independentes submetidos a análise de variância *one-way* (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey e as análises foram realizadas no programa *GraphPad* (versão 7.0). Asteriscos (\*\*\*\*) representam diferenças estatísticas em relação a controle negativo e aos demais tratamentos ( $p < 0.001$ ).

Com o intuito de selecionar somente um dos miméticos de microRNAs, mir-7 ou mir-34a, para os ensaios posteriores comparou-se a diferença de citotoxicidade induzida por pelos miRNA's alvo na linhagem MDA-MB-231. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com MRC ou com MRC combinado com reposição de microRNAs. Ou seja, o tratamento exclusivo com MRC induziu toxicidade semelhante ao tratamento em que se associou a reposição de microRNAs. Também se verificou que no grupo tratado com o mir-34a + MRC houve menor número de células viáveis do que no grupo MRC, porém sem significância na linhagem MDA-MB-231 (dados não mostrados). Por isso, nos ensaios a seguir serão apresentados resultados referentes ao mir-34a, visto que a reposição deste microRNAs resultou em maior redução da viabilidade celular.

Em relação aos ensaios realizados com a linhagem MCF-7 pôde-se notar que houve diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) na viabilidade celular em todos os tratamentos (**Figura 14**). Observou-se que os grupos mir-34a + MRC e MRC viabilidade celular foi de 54,4% ( $\pm 3,4$ ) e 75,7% ( $\pm 3,2$ ). Foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre

células tratadas apenas com mimético mir-34a em relação ao tratamento com mir-34a + MRC (viabilidade celular de 69,7 % ( $\pm 2,4$ ) e 54,4% ( $\pm 3,4$ ), respectivamente).



**Figura 14 – Efeito do tratamento com Citrato de Ródio associado a nanopartículas de Maghemita (MRC) combinado com a reposição de mir-34a sob a viabilidade de células da linhagem MCF-7 após 48 h.** O tratamento com o mimético de mir-34a combinado com MRC reduziu a viabilidade celular em relação ao tratamento apenas com MRC. Todos os dados foram normalizados com o controle e expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média de dois ensaios independentes submetidos a análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós- teste de *Tukey* e as análises foram realizadas no programa *GraphPad* (versão 7.0). Asteriscos (\*\*\*\*) diferença estatística em relação a controle negativo e os demais tratamentos. (\*\*) diferença estatística entre os grupos mir-34a + MRC e mir-34a ( $p < 0.05$ ).

Como não foi observada, na linhagem MDA-MB-231, diferença significativa na viabilidade celular entre células tratadas com mir-34a e MRC e apenas com MRC, decidimos seguir apenas com os ensaios com a linhagem MCF-7, linhagem em que se observou diferença significativa entre os dois tipos de tratamento (MRC e mir-34a + MRC).

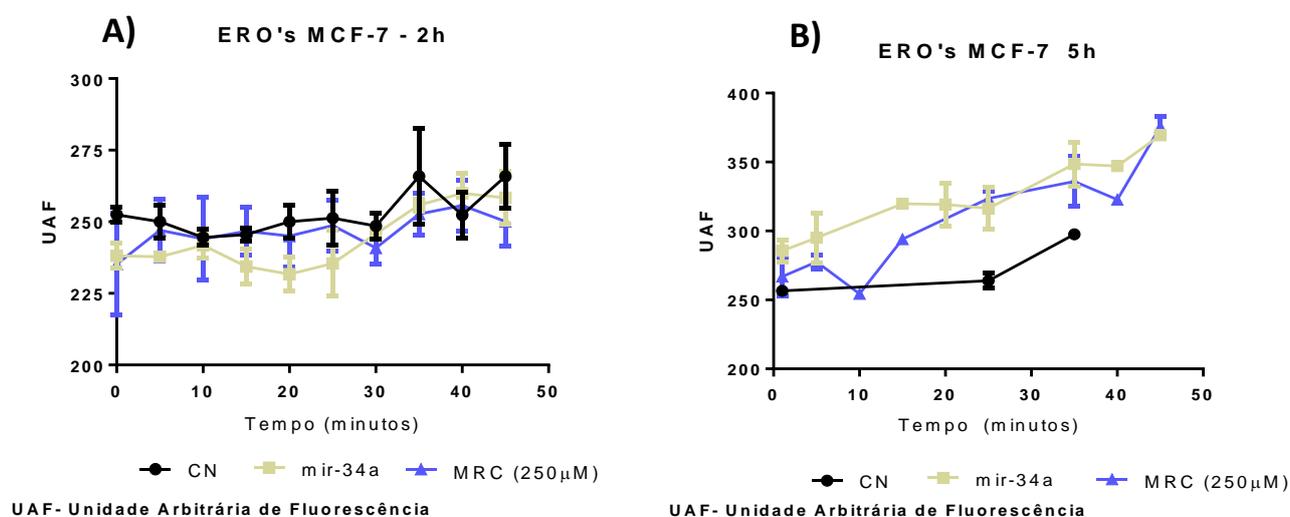
## 5.2 QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

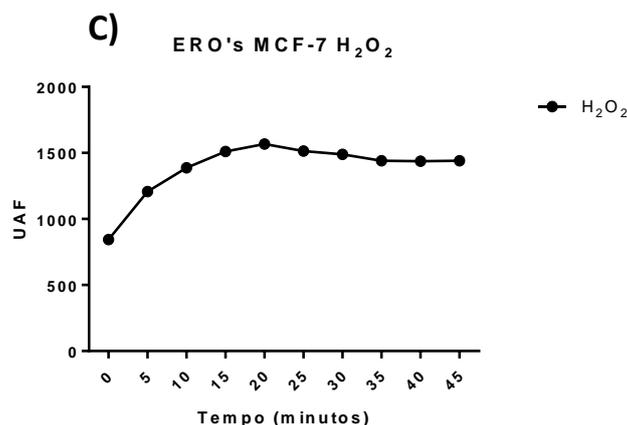
Foi realizado um ensaio para investigar se os tratamentos com MRC combinados ou não com mimético mir-34a alteravam a produção de espécies reativas de oxigênio

(EROs) em células da linhagem MCF-7 por meio de ensaio fluorimétrico utilizando DCFH. Geralmente, a produção de EROs ocorre em pouco tempo após a exposição a agentes químicos. Por isso, neste ensaio analisamos a formação de EROs em intervalos curtos após os tratamentos (2 h, 5 h) e também se avaliou após 30 h e 48 h.

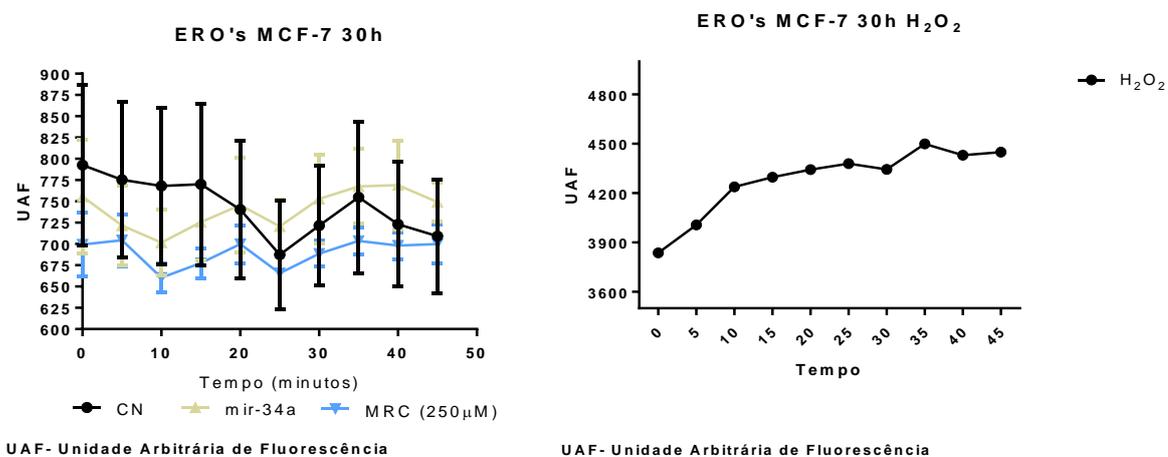
De forma geral, em todos os grupos de tratamentos pôde-se observar que a variação na produção de espécies reativas de oxigênio foi diretamente proporcional ao tempo de exposição das células da linhagem MCF-7 aos tratamentos com MRC ou mir-34a (**Figura 15**). No período de duas horas não se observou diferença na produção de EROs após os tratamentos com MRC ou mir-34a em relação ao controle negativo, independente dos tempos de leitura após incubação com DCFH (**Figura 15 A e B**). Notou-se, após cinco horas de tratamento com MRC ou mir-34a que houve variação média na produção de EROs, a partir de 20 minutos da leitura inicial, porém não foi significativa (**Figura 15 B**). Contudo, a partir de 20 minutos a produção de EROs não variou. Peróxido de hidrogênio foi empregado como controle positivo e observou que houve um aumento na produção de EROs neste tratamento.

Ademais, após 30 horas de tratamento com MRC e mir-34a também não se notou variação na quantidade de EROs (**Figura 16 A**), em todo os tempos avaliados (até 50 minutos após incubação com DCFH). A produção de EROs aumentou no decorrer do tempo com o tratamento com peróxido de hidrogênio (**Figura 18 B**). Após 48 horas (**Figura 17 A**) de tratamento com mir-34a observou-se significativa produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) em relação ao controle negativo. No entanto, em relação aos demais tratamentos não se notou diferença estatística.

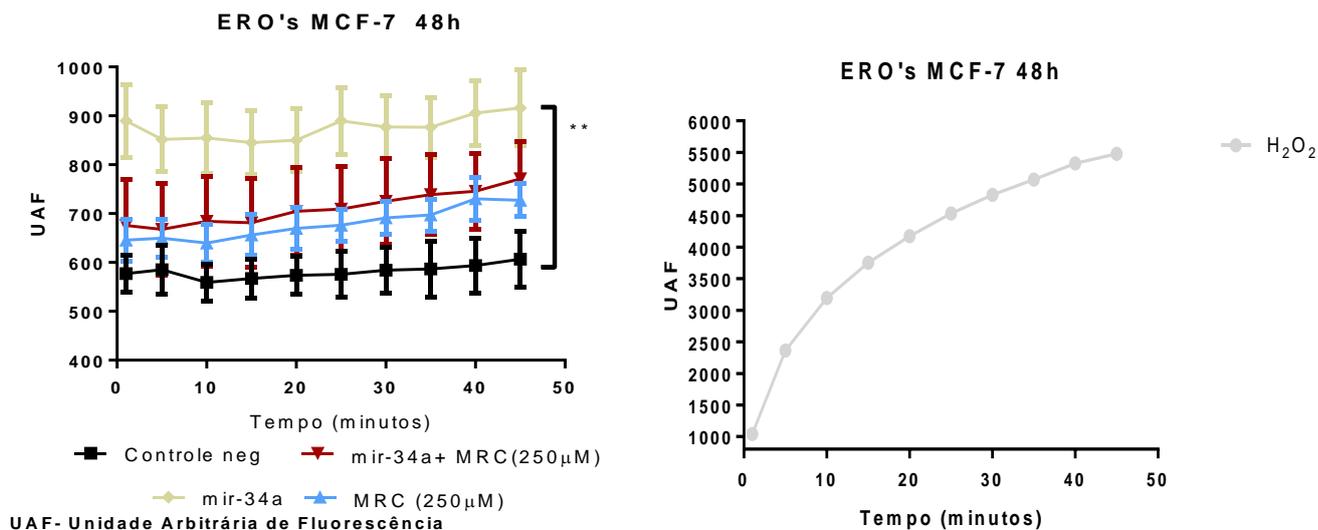




**Figura 15 –** Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) após tratamento com Citrato de Ródio associado a nanopartículas de Maghemita (MRC) ou com mimético de mir-34a na linhagem MCF-7. (A) Leitura após duas horas de tratamento. (B) Leitura após cinco horas de tratamento. (C) Leitura com controle positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Não houve diferença na produção de EROs no período de duas e cinco horas após os tratamentos com MRC ou mir-34a em MCF-7. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo e expressos como média ± desvio padrão da média de um ensaio, submetido a análise de variância (ANOVA) *two-way*, seguido de pós- teste de Dunnett. As análises foram feitas no programa GraphPad (versão 7.0).



**Figura 16 –** Quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) após tratamento com citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita (MRC) e mimético de mir-34a na linhagem MCF-7. (A) Leitura após 30 horas; (B) Leitura do controle positivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A produção de EROs foi similar em todos os grupos experimentais analisados. Todos os dados foram normalizados com o controle e expressos como média ± desvio padrão da média de ensaio submetido a análise de variância *two-way* (ANOVA), seguido de pós-teste de *Dunnett* do programa *GraphPad Prism* (versão 7.0).



**Figura 17–** Quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) da nanopartícula de citrato de ródio associado a Maghemita (MRC) e mimético mir-34a, sob a linhagem MCF-7. (A) leitura após 48 horas; (B) leitura do controle positivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A quantidade de EROS produzido é significativo no grupo tratado com mimético mir-34a em relação ao controle sem tratamentos. Todos os dados foram normalizados com o controle e expressos como média ± desvio padrão da média de dois ensaios independentes submetidos a análise de variância *two-way* (ANOVA), seguido de pós-teste multicomparativo de *Dunnett* do programa GraphPad (versão 7.0). \*\* diferença estatística do controle negativo e mir-34a (p<0,05)

### 5.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR MRC E MIR-34a

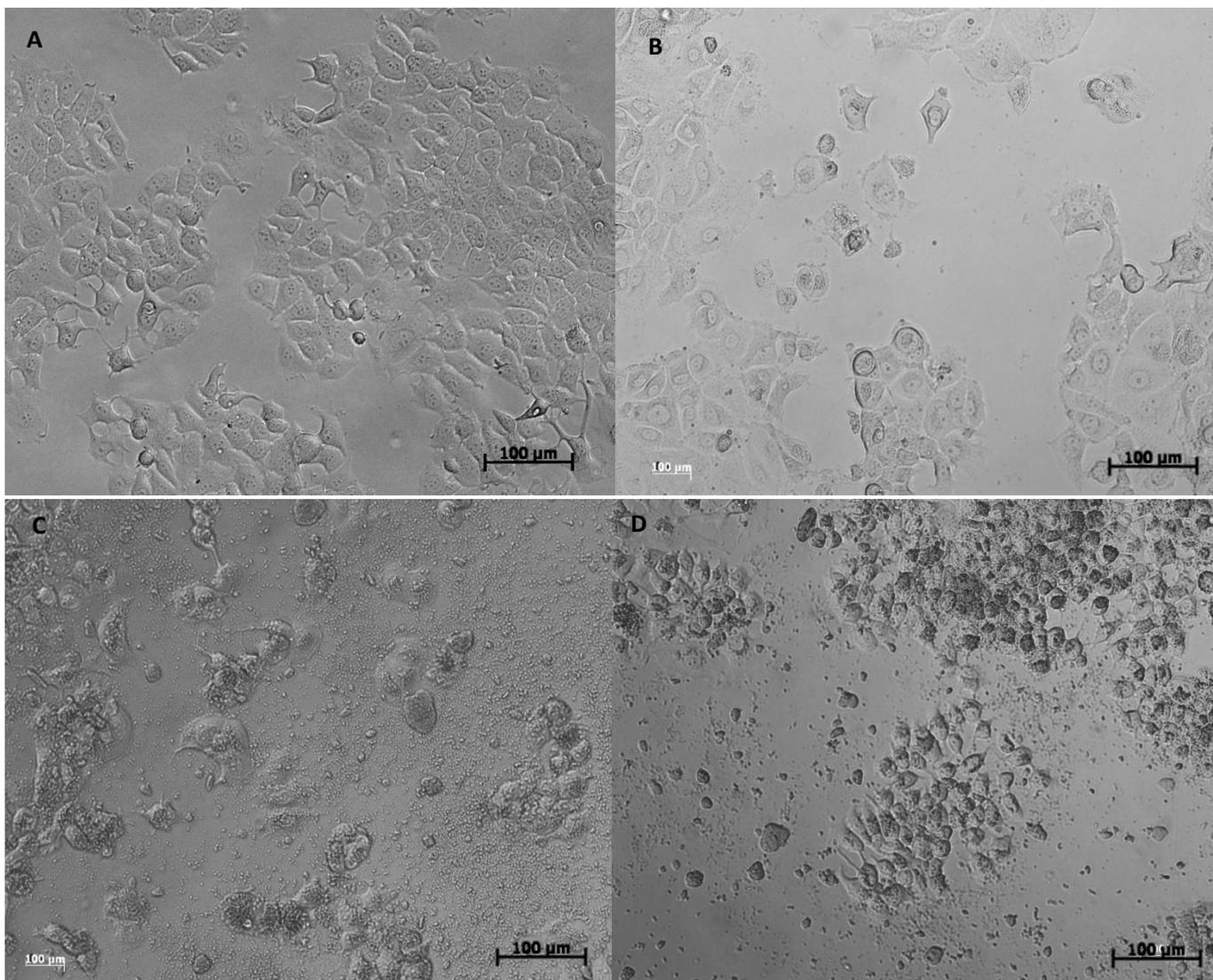
Na **figura 18** são apresentadas fotografias da morfologia das células sem tratamento (**Figura 18 A**), tratadas com reposição de mimético mir-34a (**Figura 18 B**), com MRC associado a reposição de mir-34a (**Figura 18 C**) e apenas com MRC (**Figura 18 D**).

Células sem tratamento (controle negativo), apresentaram morfologia característica da linhagem MCF-7, fusiforme e com formação de colônias de células. Nas células tratadas com mir-34a (**Figura 18 B**) notou-se alterações na morfologia como perda de prolongamentos citoplasmáticos, rompimento da membrana e redução da confluência e agregação das células.

Após o tratamento com MRC (250 μM) e MRC (250 μM) associado com a reposição de mir-34a (**Figura 18 C e D**, respectivamente) observou-se proeminentes alterações morfológicas tais como arredondamento celular e notável quantidade de fragmentos celulares dispersos. Pôde-se notar também que as células se encontravam

mais distantes umas das outras quando comparadas ao controle sem tratamento (**Figura 18 A**).

Observou-se fragmentos celulares nos grupos mir-34a + MRC e nos tratamentos exclusivos com mir-34a ou MRC (250  $\mu$ M) (**Figura 18 B a D**). Estas alterações são características de mudanças morfológicas associadas a eventos de toxicidade celular.



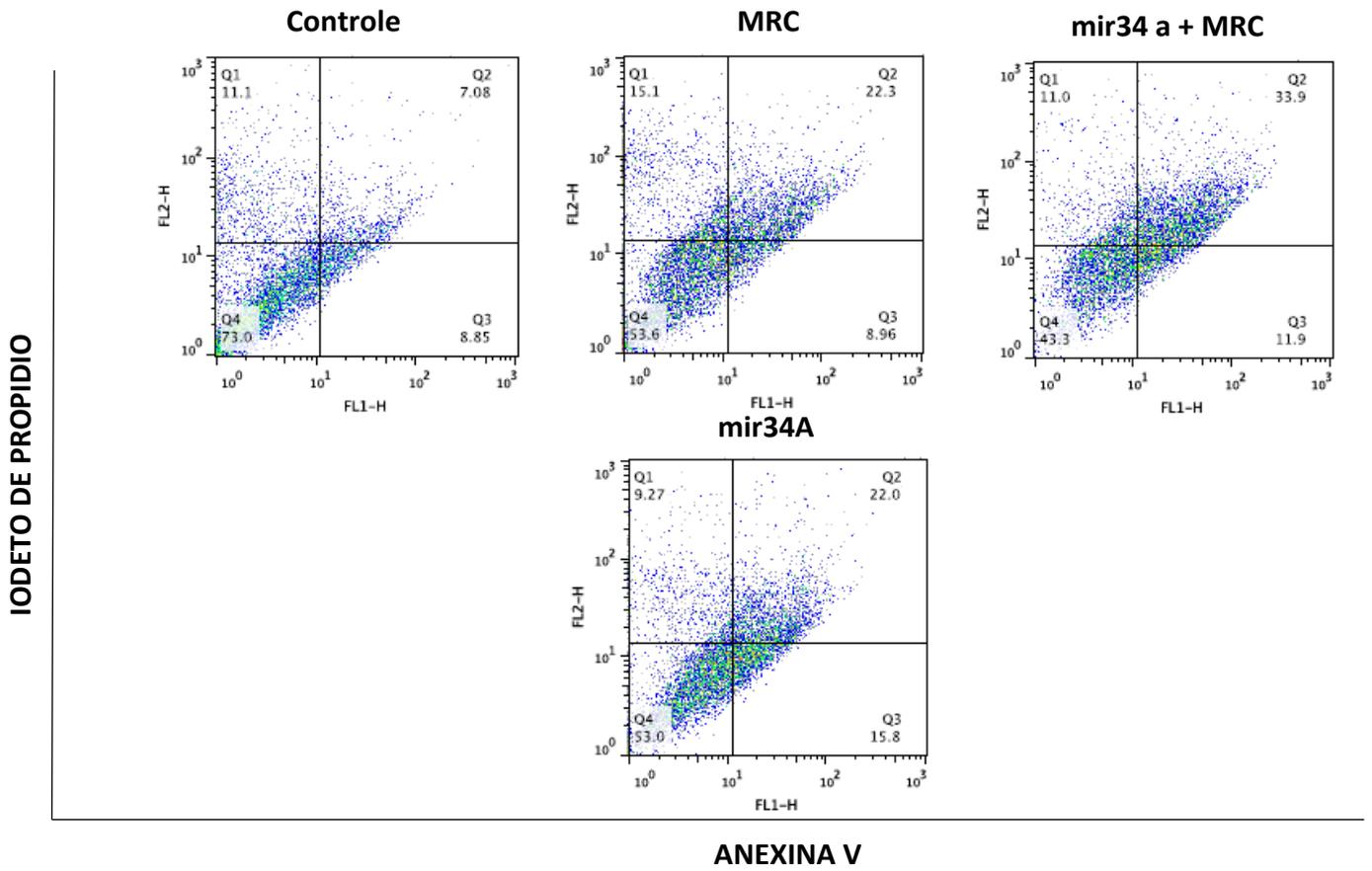
**Figura 18 – Alterações morfológicas em células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7 após tratamento com citrato de ródio associado a Maghemita (MRC) e mimético mir-34a. (A) Células não tratadas; (B) Células tratadas com reposição de mir-34a; (C) Células tratadas mir-34a+MRC; (D) Células tratadas somente com a nanopartícula MRC. A Foto mostra a mudança da morfologia nas células tratadas com o mimético mir-34a, já nos grupos que levam o tratamento em conjunto ou somente com o MRC, não há clareza de informações na mudança da morfologia por causa do MRC precipitado, somente se vê alguns pedaços de células ou restos celulares chamados de “blebs”.**

## 5.4 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR

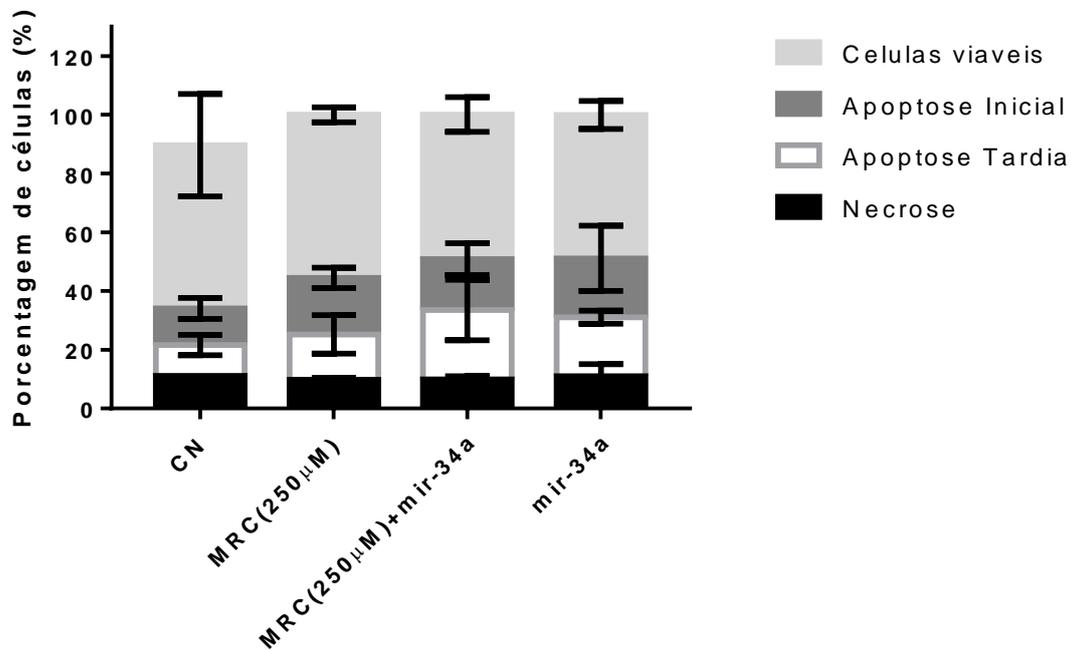
Com o intuito de identificar o tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com MRC e mir-34a as células MCF-7 foram tratadas e, após 48 horas seguiu-se com análise em citometria de fluxo. Após o período de tratamento, as células foram marcadas com Anexina-V e iodeto de Propídio e avaliadas por meio de citometria de fluxo. Este teste permite a identificação e quantificação de subpopulações de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia e em necrose.

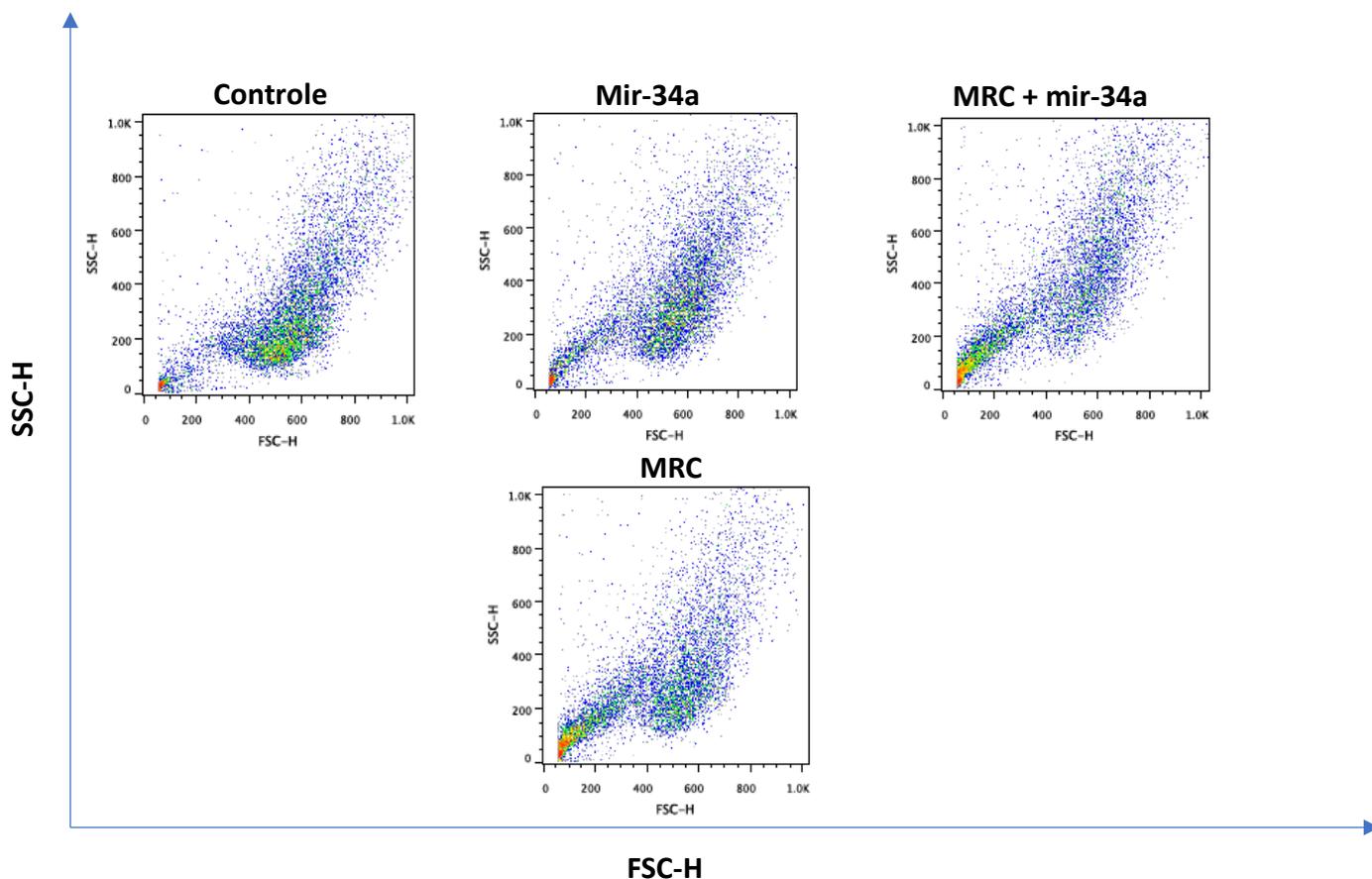
Foi observado 12,4% ( $\pm 3,6$ ), 10,5% ( $\pm 3,6$ ) e 11,1% ( $\pm 0$ ) de células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose, respectivamente em células sem tratamento (controle negativo) (**Figura 19**). No tratamento com mir-34a verificou-se 23,4% ( $\pm 7,6$ ), 19,5% ( $\pm 2,0$ ) e 8% ( $\pm 1,1$ ) de células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose, respectivamente. Após o tratamento apenas com MRC verificou-se 15,5% ( $\pm 6,7$ ), 15,8% ( $\pm 6,8$ ) e 12,7% ( $\pm 2,3$ ) sofreram de células em morte por apoptose inicial, apoptose tardia e necrose, respectivamente. No grupo tratado com mir-34a + MRC observou-se 23,6% ( $\pm 10,3$ ) de células em apoptose inicial, 17,3% ( $\pm 5,4$ ) em apoptose tardia e 10% ( $\pm 1,03$ ) em necrose. Não se notou diferença significativa entre os tipos de morte celular comparando-se células tratadas com mir-34a, MRC ou MRC + mir-34a. Entretanto, houve maior quantidade de células em processo de morte após os tratamentos do que no controle negativo (cerca de 42% versus 22%).

A)



B)





**Figura 19 - Avaliação do perfil de morte celular induzido por citrato de ródio associado a nanopartículas (MRC) e por reposição de mir-34a após 48h. (A)** distribuição das populações celulares de acordo com a positividade das marcações. Quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis, inferior direito às células em apoptose inicial, superior esquerdo às células necróticas e o superior direito células em apoptose tardia. Figura **(B)** representação gráfica dos perfis de morte celular com tratamento estatístico. O tratamento com mir-34a e nanopartícula MRC induziram predominantemente a morte celular por apoptose, mas não representam uma diferença significativa quando comparada **(C)** efeito dos tratamentos mir-34a, mir-34a + MRC e MRC, nas características morfológicas da população de células MCF-7, utilizando os parâmetros analisando SSC-H (granulosidade /complexidade citoplasmática) e FSC-H (tamanho da célula). Todos os dados foram normalizados com o controle e expressos como média  $\pm$  do desvio padrão da média de dois ensaios independentes submetidos a análise de variância *two-way* (ANOVA) ( $p < 0,05$ ), seguido de pós- teste comparativo de *Dunnet* do programa GraphPad (versão 7.0).

## 7. DISCUSSÃO

Neste estudo, nós demonstramos que o CR e o MRC induziram a redução da viabilidade celular na linhagem MDA-MB-231 e MCF-7 nas doses de 50  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 250  $\mu$ M e 300  $\mu$ M tendo efeito citotóxico dose dependente. O MRC teve seu efeito potencializado em relação a CR em ambas as linhagens.

A linhagem MDA-MB-231 se mostrou mais sensível aos tratamentos utilizados, pois observou-se pronunciado efeito citotóxico de MRC em todas as doses testadas. Entretanto, na linhagem MCF-7 somente as doses de 250  $\mu$ M e 300  $\mu$ M de MRC foram citotóxicas. Estes resultados corroboram os estudos de Chaves (2017) e Carneiro (2011) em que foi demonstrado que, após 48 h de tratamento com MRC, a linhagem MDA-MB-231 se mostrou mais sensível ao tratamento do que a linhagem MCF-7.

Células da linhagem MDA-MB-231 são caracterizadas pela ausência de expressão de receptor de estrógeno, progesterona e HER-2 e, portanto, são classificadas como triplo negativas. Por isso, apresentam potencial invasivo e estas características para um tumor estão relacionadas com um pior prognóstico da doença (MADEIRA *et al.*, 2012). Nós demonstramos que as terapias empregadas neste estudo foram mais eficientes em células MDA-MB-231 do que em células da linhagem MCF-7 (triplo positiva para receptor de estrógeno, progesterona e HER-2). Isto representa um achado interessante visto que, o tumor com perfil imunohistoquímico triplo negativo, não é suscetível à terapias hormonais ou ainda à quimioterápicos como doxorrubicina e paclitaxel (ROUZIER *et al.*, 2005; CAREY, 2006). Nós demonstramos que células da linhagem MDA-MB-231 foram susceptíveis aos tratamentos com CR e MRC.

Também foi demonstrado que o tratamento com (MRC combinado com a reposição de mir-34a reduziu significativamente a viabilidade celular e este efeito foi relacionado com a atividade citotóxica deste em ambas as linhagens estudadas (MDA-MB-231 e MCF-7). É conhecido que mir-34a está menos expresso em linhagens de câncer triplo negativo quando comparada a linhagens celulares epiteliais normais (GAUR *et al.*, 2007; KATO *et al.*, 2009). O microRNA mir-34a está pouco expresso na linhagem MDA-MB-231 (Kim *et al.*, 2016) e, de acordo com estudos conduzidos por (RUI *et al.*, 2018) o uso do mimético mir-34a tem efeito inibitório na viabilidade celular enquanto que o uso do antagonista (Anti-mir) tem efeito oposto.

Em nossos ensaios, observou-se pronunciada redução na viabilidade de células da linhagem MDA-MB-231 após os tratamentos com mimético de mir-34a (30 nM) em

associação com MRC (250  $\mu$ M). É descrito na literatura que a associação terapêutica de reposição de mir-34a com quimioterápicos como doxorrubicina, cisplatina e paclitaxel levaram a maior redução da viabilidade celular em relação ao seu uso isolado em células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 (WU *et al.*, 2014). Portanto, nossos achados estão de acordo com que é descrito na literatura.

Na linhagem MCF-7 mir-34a também potencializou o efeito de MRC. Células de linhagem MCF-7 possuem uma expressão reduzida de mir-34a quando comparada à células não tumorais e este fenótipo está envolvido na regulação da apoptose, invasão e proliferação em células tumorais (LI *et al.*, 2014). Por outro lado, em relação aos nossos achados com mir-7 não observamos, na linhagem MDA-MB-231, o mesmo efeito em relação ao mir-7. Células desta linhagem tratadas com mir-7 (30 nM) + MRC (250  $\mu$ M) tiveram a viabilidade celular similar ao tratamento exclusivo com MRC. Estudos demonstram que a expressão de mir-7 está associada à metástase visto que foi encontrado em menor quantidade em pacientes que tiveram reincidência tumoral devido a metástase e também que a reposição deste miRNA, em estudos *in vitro*, inibiu a proliferação e progressão de células da linhagem MDA-MB-231. Em nosso estudo também observamos que a reposição de mir-7 resultou na inibição da viabilidade celular. As alterações morfológicas observadas em células MCF-7 tratadas com MRC (250  $\mu$ M) e mir-34a estão associadas à toxicidade da terapia.

Ainda, verificou-se nos tratamentos com MRC e com MRC + mir-34a maior percentual de células em morte celular (apoptose e necrose) do que em células sem tratamento. No entanto, o percentual de células em morte celular no controle negativo foi elevado (em torno de 22%). Desta forma, será necessário realizar novos ensaios a fim de obter resultados mais consistentes para correlacionar com os dados de toxicidade.

Após os tratamentos por duas, cinco e trinta horas (Figura 15 A e 16 A) não houve aumento na produção de EROs. Contudo, no período de 48 horas observou-se que os níveis de EROs foram maiores em células que se aplicou o mimético de mir-34a (Figura 17). É relatado na literatura que a reposição de mir-34a induz o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (BAI *et al.*, 2011). LI e colaboradores demonstraram que o uso de mimético de mir-34a em células de glioma humano, da linhagem A172, induziu o aumento de EROs ocasionando apoptose. Em estudos preliminares, realizados pelo nosso grupo, foi observado que MRC induziu aumento na produção de EROs (CHAVES *et al.*, 2015).

## CONCLUSÕES

- Células de adenocarcinoma mamário da linhagem MDA-MB-231 foram mais sensíveis aos tratamentos com CR e MRC do que células da linhagem MCF-7.
- MRC foi mais citotóxico do que CR em todas as doses (50 a 300  $\mu$ M) e em ambas as linhagens celulares testadas (MCF-7 e MDA-MB-231).
- A combinação terapêutica de MRC e miRNAs induz maior efeito citotóxico do que o tratamento exclusivo com mir-7 ou mir-34a.
- A citotoxicidade do tratamento induzida por MRC foi similar ao do tratamento por MRC e microRNAs na linhagem MDA-MB-231.
- Mir-34a potencializa a atividade citotóxica de MRC em torno de 16% células da linhagem MCF-7.
- Os tratamentos com mir-34a e mir-34a associado a MRC (250 $\mu$ M) elevam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na linhagem MCF-7, porém a maior modulação é no grupo tratado com mir-34a.
- O tratamento das células com mir-34a e MRC, isolados ou juntos, altera a morfologia, que está relacionada a processos de citotoxicidade e estas alterações são mais pronunciadas após o tratamento com a terapia combinatória de MRC e mir-34a em células da linhagem MCF-7.
- Não há diferença entre as mortes por apoptose e necrose em tratamentos com MRC e mir-34a.

## **PERSPECTIVAS**

- Confirmar com a linhagem MCF-7:
  - Resultados do ensaio de tipo de morte celular;
  - Resultados de produção de ROS por ensaio qualitativo, através da obtenção de imagens por microscopia de fluorescência;
- Reproduzir os ensaios com a linhagem MDA-MB-231 e MCF-10A, com doses reduzidas;
- Analisar morfologia das linhagens por microscopia de varredura (MEV);

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALBERTS, B. ; JOHNSON, A. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell**. Garland Science, 2002.

ALBERTS, B. Biologia molecular da celula. [s.l.] Artes Medicas, 2010.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. Biologia Molecular da Célula. In: Ciclo Celular e Morte Celular Programada. 4a ed., Editora Artumed, Porto Alegre, p. 983-1025, 2004.

ALMEIDA, Z. G.; FARIAS, L. R. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS QUE CAUSAM CÂNCER. Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde, v. 3, n. 1, p. 19–26, 27 jun. 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Breast Cancer. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast->. Acesso em: 20 fev 2019

ANTONELLIS, P. *et al.* MiR-34a Targeting of Notch Ligand Delta-Like 1 Impairs CD15+/CD133+ Tumor-Propagating Cells and Supports Neural Differentiation in Medulloblastoma. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24584, 12 set. 2011.

ARTURSSON, P. *et al.* Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharmaceutical research*, v. 11, n. 9, p. 1358–61, set. 1994.

AXELROD, R., AXELROD, D. E.; PIENTA, K. J. Evolution of cooperatiion among tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 103, n. 36, p. 13474-13479, 2006.

BAI, X.-Y. *et al.* miR-335 and miR-34a Promote renal senescence by suppressing mitochondrial antioxidative enzymes. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 22, n. 7, p. 1252–61, jul. 2011.

BAI, X.-Y. *et al.* miR-335 and miR-34a Promote renal senescence by suppressing mitochondrial antioxidative enzymes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, v. 22, n. 7, p. 1252–61, jul. 2011.

BANERJEE, M. *et al.* Cytotoxicity and cell cycle arrest induced by andrographolide lead to programmed cell death of MDA-MB-231 breast cancer cell line. **Journal of biomedical science**, v. 23, p. 40, 16 abr. 2016.

BARBOSA, K. F. B.; MARIA, N.; COSTA, B.; DE CÁSSIA, R.; ALFENAS, G.; OLIVEIRA, S.; PAULA, D. E.; PAULA, V.; MINIM, R.; BRESSAN, J. Revista de Nutrição Oxidative stress: concept, implications and modulating factors **Rev. Nutr.** 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v23n4/v23n4a13.pdf>>. Acesso em: 8 fev. 2019.

BEAR, J. L. *et al.* Interaction of Rhodium(II) carboxylates with molecules of biologic importance. **Cancer chemotherapy reports**, v. 59, n. 3, p. 611–20, 1975.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, n. 11, p. 1649-1659, 2004.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 1 nov. 2018.

BRUGAROLAS, J. ; MOBERG, K. ; BOYD, S.D. ; TAYA, Y.; JACKS, T. ; LEES, J.A. ; **Inhibition of Cyclin – Dependent Kinase 2 by p21 is Necessary for Retinoblastoma Protein – Mediated G1 Arrest After Gamma – Irradiation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96, p. 1002 – 1007, 1999.

BURNETT, J. C.; ROSSI, J. J. RNA-Based Therapeutics: Current Progress and Future Prospects. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 1, p. 60–71, 27 jan. 2012.

CADIOLI, L. P.; SALLA, L. D. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia. [s.l: s.n.]. v. 1

CALIN, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 2999–3004, 2 mar. 2004.

CALIN, G. A. *et al.* Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15524–15529, 26 nov. 2002.

CARNEIRO, M. L. B.; NUNES, E. S.; PEIXOTO, R. C.; OLIVEIRA, R. G.; LOURENÇO, L. H.; DA SILVA, I. C.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DE SOUZA, A. R.; LACAVALA, Z. G.; BÁO, S. N. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, p.11-27, 2011.

CARNEIRO, M. L.; PEIXOTO, R. C. A.; JOANITTI, G. A.; OLIVEIRA, R. G. S.; TELLES, L. A. M.; MIRANDA-VILELA, A. L.; BOCCA, A. L.; VIANNA, L. M. S.; DA SILVA, I. C. R.; DE SOUZA, A. R.; LACAVA, Z. G. M.; BÁO, S. N. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 11, p. 4, 2013.

CARNEIRO, M.L.B. Efeitos Biológicos de citrato de ródio II livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos in vitro e in vivo. Tese de doutorado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília. Brasília. 2011.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, v. 136, n. 4, p. 642–655, 20 fev. 2009.

CARVALHO, H. D. A. Radioterapia exclusiva &quot;versus&quot; radioterapia associada à quimioterapia no carcinoma de pulmão não de pequenas células localmente avançado (estádios IIIA e IIIB) *J Pneumol.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://www.jornaldepneumologia.com.br/pdf/1997\\_23\\_2\\_7\\_portugues.pdf](http://www.jornaldepneumologia.com.br/pdf/1997_23_2_7_portugues.pdf)>. Acesso em: 14 abr. 2019.

CHAVES, N. L. Estudo de morte celular em células MCF-7 tratadas com citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita. Dissertação de mestrado em Biologia Animal. Universidade de Brasília. Brasília. 2013.

CHAVES, N. L.; LOPES, C. A. P.; CARNEIRO, M. L. B. C.; DE SOUZA, A. R.; DA SILVA, M. O.; CORRÊA, J. R.; BÁO, S. N. Rhodium Citrate Associated with Maghemite Nanoparticles Causes DNA Fragmentation Independently of Caspases 3 and Mediated by Reactive Oxygen Species. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, v. 6, n.5, p.1000312, 2015.

CHEN, F., V. VALLYATHAN, *et al.* "Cell apoptosis induced by carcinogenic metals." *Molecular and Cellular Biochemistry*.v.222. N.1.p.183-188. 2001

CHEN, F.; HU, S.-J. Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 26, n. 2, p. 79–86, fev. 2012.

CHUNG, W.G.; MIRANDA, C.L., STEVENS, J.F.; MAIER, C.S. *Food Chem Toxicol.* v.47. n.4. p.827-36. 2009.

COMÇA, Ş.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3147–54, jun. 2015.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharm Res**, v. 23, n. 7, p. 1417-50, 2006

DA SILVA, R. C. F. Guia para o Diagnóstico Precoce do Câncer Geneva World Health Organization, , 2017. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/rbc/n\\_63/v01/pdf/08-review-guide-to-cancer-early-diagnosis.pdf](http://www1.inca.gov.br/rbc/n_63/v01/pdf/08-review-guide-to-cancer-early-diagnosis.pdf)>. Acesso em: 14 abr. 2019

DE SOUZA, A. R. *et al.* Water-soluble rhodium(II) carboxylate adducts: cytotoxicity of the new compounds. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 1–5, out. 1996.

DIAS, E.M. ; **Tbx2 Is Overexpressed and Plays an Important Role in Maintaining Proliferation and Suppression of Senescence in Melanomas.** *Cancer Research*, v. 65, p. 2260 – 2268, 2005.

DURAN, N.; AZEVEDO, M. M. M.. O Que é Nanobiotecnologia? Atualidades e Perspectivas. Monografia LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP, 2002. Disponível em : <http://lqes.iqm.unicamp.br>. Acessado em 13 out.2014.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; TEIXEIRA, E Z. NANOTECNOLOGIA E NANOBIOLOGIA: CONCEITOS BÁSICOS, 2011.

European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) MDAMB231. Disponível em: [https://www.phculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=92020424&collection=ecacc\\_gc](https://www.phculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=92020424&collection=ecacc_gc). Acesso 01 de fev. 2019.

FALQUEIRO, A. M. Nanocápsulas contendo selol e fluído magnético: preparação, caracterização e avaliação da atividade antitumoral in vitro. Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 23 jan. 2012.

FAN, F. *et al.* MicroRNA-34a promotes mitochondrial dysfunction-induced apoptosis in human lens epithelial cells by targeting Notch2. **Oncotarget**, v. 8, n. 66, p. 110209–110220, 15 dez. 2017.

FATIMA DA SILVA, M. *et al.* Quantification of Maghemite Nanoparticles in Biological Media by Ferromagnetic Resonance and Its Alteration by Conjugation with Biological

Substances. In: **Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers**. Boston, MA: **Springer** US, 1997. p. 171–176.

FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R. *et al.* Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 16, n. 10, p. 1576–81, out. 1999.

FERRAZ, A. A. B.; DE SIQUEIRA, L. T. Obesidade e Câncer. [s.l: s.n.]. Disponível em:  
<<http://www.ufmt.br/ppgcs/images/uploads/editais/papers2019/Linha1/Obesidadeecancer>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 19 fev. 1998.

FOEKENS, J. A. *et al.* Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 35, p. 13021–13026, 2 set. 2008.

FRAZIER, J. M. ***In vitro* Toxicity testing**. Applications to safety evaluation. New York, Marcel Dekker, Inc., 1992. p.300.1992.

GARDINER, J.; OVERALL, R., MARC, J. The nervous system cytoskeleton under oxidative stress. *Diseases*. v.1. p.36-50. 2013.

GOUVEIA, S. DA S.; LIMA, A. A. RELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E A PROMOÇÃO CARCINOGENICA INSERT RELATIONSHIP BETWEEN REACTIVE SPECIES OF OXYGEN AND CARCINOGENIC PROMOTION. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, v. 20, n. 3, p. 174–179, 2017.

GREGORY, R. I.; SHIEKHATTAR, R. MicroRNA Biogenesis and Cancer: Figure 1. **Cancer Research**, v. 65, n. 9, p. 3509–3512, 1 maio 2005.

GU, F. X. *et al.* Targeted nanoparticles for cancer therapy. **Nano Today**, v. 2, n. 3, p. 14–21, 1 jun. 2007.

GU, F. X.; KARNIK, R.; WANG, A. Z.; ALEXIS, F.; LEVY-NISSENBAUM, E.; HONG, S.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Targeted nanoparticles for cancer therapy. **Nano Today**, v. 2, n. 3, p. 14-21, 2007.

HU, Y. *et al.* Nanodevices in diagnostics. Wiley interdisciplinary reviews. **Nanomedicine and nanobiotechnology**, v. 3, n. 1, p. 11–32, 2011.

INCA. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde.

IORIO, M. V. *et al.* Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. **The Breast**, v. 20, p. S63–S70, out. 2011.

IORIO, M. V. *et al.* MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 16, p. 7065–7070, 15 ago. 2005.

JORDAN, M.A., WILSON L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for câncer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol*, v. 10, n.1, p.123-30. **1998**.

KALINOWSKI, F. C. *et al.* microRNA-7: A tumor suppressor miRNA with therapeutic potential. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 54, p. 312–317, set. 2014.

KATSAROS, N.; ANAGNOSTOPOULOU, A. Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 42, n. 3, p. 297–308, jun. 2002.

KIM, D. Y. *et al.* A novel miR-34a target, protein kinase D1, stimulates cancer stemness and drug resistance through GSK3/3B2;-catenin signaling in breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 12, p. 14791–802, 22 mar. 2016.

KIM, J. *et al.* Designed Fabrication of Multifunctional Magnetic Gold Nanoshells and Their Application to Magnetic Resonance Imaging and Photothermal Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 45, n. 46, p. 7754–7758, 27 nov. 2006.

KREK, A. *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. **Nature Genetics**, v. 37, n. 5, p. 495–500, 3 maio 2005.

KRELL, J. *et al.* miRNAs in breast cancer: ready for real time? **Pharmacogenomics**, v. 13, n. 6, p. 709–719, abr. 2012.

KRÜTZFELDT, J. *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 685–689, 30 dez. 2005.

KRÜTZFELDT, J. *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 685–689, 30 dez. 2005.

KUMAR, S. Caspase function in programmed cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 14, n. 1, p. 32–43, 3 jan. 2007.

LAMKANFI, M. *et al.* Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. **Cell Death & Differentiation**, v. 14, n. 1, p. 44–55, 20 jan. 2007.

LEE, C.-M. *et al.* Oleyl-Chitosan Nanoparticles Based on a Dual Probe for Optical/MR Imaging in Vivo. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 186–192, 16 fev. 2011.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 3 dez. 1993.

LEE, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO journal**, v. 23, n. 20, p. 4051–60, 13 out. 2004.

LEE, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415–419, 25 set. 2003.

LEMOS CHAVES, N. *et al.* Rhodium Citrate Associated with Maghemite Nanoparticles Causes DNA Fragmentation Independently of Caspases 3 and Mediated by Reactive Oxygen Species. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 06, n. 05, p. 1–10, 30 jul. 2015

LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. "Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited". **Pharmacology & Therapeutics**, 128, 336. 2010.

LI, S.-Z. *et al.* MicroRNA-34a induces apoptosis in the human glioma cell line, A172, through enhanced ROS production and NOX2 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 444, n. 1, p. 6–12, 31 jan. 2014.

LI, S.-Z. *et al.* MicroRNA-34a induces apoptosis in the human glioma cell line, A172, through enhanced ROS production and NOX2 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 444, n. 1, p. 6–12, 31 jan. 2014.

LI, X. J.; REN, Z. J.; TANG, J. H. MicroRNA-34a: a potential therapeutic target in human cancer. **Cell death & disease**, v. 5, n. 7, p. e1327, 17 jul. 2014.

LIMA, I. R. Efeito do zinco na biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de grânulos de zinco-apatita 5% em comparação com a hidroxiapatita. Tese (Dissertação de mestrado na área de Engenharia Metalúrgica e de Materiais) Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 2006.

LIU, C. *et al.* The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 211–215, 16 fev. 2011.

LIU, H. MicroRNAs in breast cancer initiation and progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 21, p. 3587–3599, 28 nov. 2012.

MADEIRA K. P. *et al.* Triple negative breast cancer: clinicopathological characteristics, challenges and therapy. In: CHEN, G. (Ed.). Estrogen Receptors: Mechanisms, Structure and Role in Disease. New York: Nova Publishers, cap. 7, 2012.

Magder, S. "Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?" **Critical Care**, 10, 208. 2006.

MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 11, p. 592–599, nov. 2009.

MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2216–29, maio 2008.

MIRNA THERAPEUTICS, I. Um Estudo Multicêntrico de Fase I de MRX34, MicroRNA miR-RX34 Injeção Lipossômica - Visualização em Texto Completo - ClinicalTrials.gov. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01829971?term=mirna+therapeutics>>. Acesso em: 14 abr. 2019.

MØLLER, P.; WALLIN, H. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. **Mutation research**, v. 410, n. 3, p. 271–90, jun. 1998.

MORA, L. D. Revista Portuguesa de Cirurgia. [s.l.] Sociedade Portuguesa de Cirurgia, 2013.

MOSES, S. L.; EDWARDS, V. M.; BRANTLEY, E. Cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, without Harming MCF-10A **Healthy Cells**. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 07, n. 02, p. 1–11, 30 abr. 2016.

MURAWA,P.; MURAWA, D.; ADAMCZYK, B.; POLOM, K.Breast cancer: Actual methods of treatment and future trends. **Report Practical Oncol and Radiotherapy** 2014; v.19, n.3, p. 165–172.May/2014

NICULESCU, A.B. ; CHEN, X. ; SMEETS, M. ; HENGST, L. ; PRIVES, C. ; REED, S.I. ; Effects of p21 (Cip1- Waf1) at Both the G1 and The G2-M Cell Cycle Transitions: pRb is a Critical Determinant in Blocking DNA Replication and in Preventing Endoreduplication. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, p. 629 – 643, 1998.

OLIVEIRA, M. C. DE; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333–1342, dez. 2010.

ORIA, R, B, BRITO, G.A.C.. SISTEMA DISGESTORIO: INTEGRAÇÃO BASICO CLINICA. São Paulo : **Blucher**, 2016.

ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. D. C. SISTEMA DIGESTÓRIO: INTEGRAÇÃO BÁSICO-CLÍNICA. São Paulo: [s.n.].

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2201–2204, set. 1999.

PASETTO, L. M. *et al.* The development of platinum compounds and their possible combination. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 60, n. 1, p. 59–75, out. 2006.

PASQUALINI, J. R. Breast cancer : prognosis, treatment, and prevention. **Informa health care**. 2º edição. Publicado Abril 11, 2008

PEIXOTO, R. C. A. Avaliação toxicológica e antitumoral do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita em modelo experimental de câncer de mama. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, 2012.

POGRIBNY, I. P. *et al.* Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 8, p. 1785–1794, 15 out. 2010.

POLETTI, F. S. *et al.* Controlling the size of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by emulsification–diffusion technique using ethanol as surface agent. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 324, n. 1–3, p. 105–112, 1 jul. 2008.

PORTERO, A. *et al.* Reacetylated chitosan microspheres for controlled delivery of antimicrobial agents to the gastric mucosa. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, n. 6, p. 797–809, 29 jan. 2002.

PRADO, P. A. F. Avaliação do possível efeito dual (antioxidante e/ou pró-oxidante) e ação neuroprotetora do ebselen, ácido caféico e memantina em células neurais (neuro-2a) in vitro. Minas Gerais: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de Minas Gerais, 2012.

RAI, K. *et al.* Liposomal Delivery of MicroRNA-7-Expressing Plasmid Overcomes Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor-Resistance in Lung Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 9, p. 1720–1727, 1 set. 2011.

RESENDE, R. R. NANOTECNOLOGIA VERDE PARA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS. In: *Biotecnologia Aplicada a Agroindústria*. 1. ed. [s.l: s.n.]. p. 1069.

RICARTE FILHO, J. C. M.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1102–1107, dez. 2006.

ROCHA, M.; ARCANJO, R.; LOPES, C.; CARNEIRO, M.; SOUZA, A.; BÁO S. Modulation of fibronectin and laminin expression by Rhodium (II) citrate-coated maghemite nanoparticles in mice bearing breast tumor. **Scientific Reports**, v.7, p. 1-11, 2017. 7

ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the Biological Characteristics of the Antioxidant Micronutrients. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 96, n. 7, p. 693–702, jul. 1996.

ROGERO, S. O. *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, jun. 2003.

RUI, X. *et al.* MicroRNA-34a suppresses breast cancer cell proliferation and invasion by targeting Notch1. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 16, n. 6, p. 4387–4392, 17 set. 2018.

SCHWARZ, D.S.; HUTVÁGNER, G; D.U., T; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P.D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, 115:199-208, 2003.

SHARMA, G. N. *et al.* Various types and management of breast cancer: an overview. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 1, n. 2, p. 109–26, abr. 2010.

SILVA, C.T.; JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**. v.66. n.1. São Paulo. 2014

SILVA, P. A.; RIUL, S. S.. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Rev Bras Enferm**, v.64, n.6, p.1016-21, 2011.

SMELTZER, S. C., B. G. BARE, *et al.* "Histórico e tratamento de pacientes com diabetes mellitus." Brunner LS, organizador. Brun- ner/Suddarth: tratado de enfermagem médico cirúrgica. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan: 933-983. 2002.

SVILAR, D.; GOELLNER, E. M.; ALMEIDA, K. H.; SOBOL, R. W. "Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage". **Antioxidants & Redox Signaling**, 14, 2491. 2010.

TARTAJ, P. *et al.* The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R182–R197, 7 jul. 2003.

TAVAZOIE, S. F. *et al.* Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. **Nature**, v. 451, n. 7175, p. 147–152, 10 jan. 2008.

TRACHOOTHAM, D. *et al.* Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by  $\beta$ -phenylethyl isothiocyanate. **Cancer Cell**, v. 10, n. 3, p. 241–252, set. 2006.

VALKO, M. *et al.* "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". **Int J Biochem Cell Biol**, vol. 39, no 1. 2007.

WEINBERG, R. A. A biologia do cancer. Artmed. 1ed. 2008.

WING, R. M. *et al.* The primary mode of binding of cisplatin to a B-DNA dodecamer: C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G. **The EMBO journal**, v. 3, n. 5, p. 1201–6, maio 1984.

XU, X.; FORBES, J.G.; COLOMBINI, M. J. **Membr Biol.** v.180. n.1. p.73-81. 2001

YOKOYAMA, M. Drug targeting with nano-sized carrier systems. **Journal of Artificial Organs**, v. 8, n. 2, p. 77–84, 8 ago. 2005.

ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current opinion in chemical biology**, v. 7, n. 4, p. 481–9, ago. 2003.

ZHANG, H. *et al.* MiR-7, Inhibited Indirectly by LincRNA HOTAIR, Directly Inhibits SETDB1 and Reverses the EMT of Breast Cancer Stem Cells by Downregulating the STAT3 Pathway. **Stem Cells**, v. 32, n. 11, p. 2858–2868, nov. 2014.

ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. **Nano Today**, v. 4, n. 1, p. 66–80, 1 fev. 2009.

ZHANG, N. *et al.* microRNA-7 is a novel inhibitor of YY1 contributing to colorectal tumorigenesis. **Oncogene**, v. 32, n. 42, p. 5078–5088, 3 out. 2013.

ZHAO, J. *et al.* MicroRNA-7: a promising new target in cancer therapy. **Cancer Cell International**, v. 15, n. 1, p. 103, 29 dez. 2015a.

ZYNGIER, S.; KIMURA, E.; NAJJAR, R. Antitumor effects of rhodium (II) citrate in mice bearing Ehrlich tumors. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 22, n. 3, p. 397–401, 1989.

