



**Universidade de Brasília
Faculdade UnB de Planaltina
Licenciatura em Ciências Naturais**

**Modulação da Expressão de γ -actina Induzida por Citrato de
Ródio em Células de Carcinoma Mamário Humano**

Stefanny de Fátima Guedes Cunha

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcella Lemos Brettas Carneiro

Planaltina-DF
Dezembro-2017



**Universidade de Brasília
Faculdade UnB de Planaltina
Licenciatura em Ciências Naturais**

Modulação da Expressão de γ -actina Induzida por Citrato de Ródio em Células de Carcinoma Mamário Humano

Stefanny de Fátima Guedes Cunha

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcella Lemos Brettas Carneiro

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora, como exigência parcial para a obtenção de título de Licenciado do Curso de Licenciatura em Ciências Naturais, da Faculdade UnB Planaltina, sob a orientação da Prof^a Dr^a Marcella Lemos Brettas Carneiro.

Planaltina-DF
Dezembro-2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por toda a sabedoria e discernimento que Ele me concedeu para viver todas as oportunidades e aprendizados durante a graduação.

À minha família, que está sempre me apoiando e encorajando a cada decisão tomada e vibrando a cada vitória “científica” ainda que sem compreender direito o que se trata! Agradeço em especial a minha avó Geralda por todas as orações e entrega da minha vida às mãos de Nossa Senhora de Fátima.

Ao João, meu namorado, amigo e companheiro das demasiadas horas de estudos via Skype, e o melhor professor de física (passei!!!!). Obrigada por todo o amor, conselho e encorajamento que todo dia me transmite. Obrigada também por toda a paciência durante a finalização desse trabalho.

As grandes amigas que a UnB me presenteou: Mayara e Sabrina. Vocês são meu exemplo de dedicação e comprometimento! Que a nossa amizade dure por toda a vida!

Aos colegas e amigos do Ciência Sem Fronteiras, em especial Gabi e Victor. Obrigada por fazerem do intercâmbio uma experiência ainda melhor e por serem minha família nos longos 18 meses longe de casa.

Ao professor Dr. Nicholas Buchon e ao Dr. Alessandro Bonfini pela oportunidade incrível de poder estagiar e aprender em seu laboratório em Cornell University. Essa experiência despertou ainda mais em mim a paixão pela ciência e me mostrou os desafios que precisamos superar para chegar aonde queremos.

À minha orientadora, a professora Dr. Marcella Lemos, pela oportunidade, credibilidade e autonomia a mim concedida. Por todas as experiências que totalizaram no meu crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas do laboratório de Microscopia Eletrônica, por toda disponibilidade, prontidão, ajuda, conselhos e pelas maravilhosas risadas na folga dos experimentos. Agradeço especialmente à Yasmin, por toda a paciência e carinho ao me ajudar desde o começo dos meus experimentos. Palavras não são suficientes para retribuir tudo o que fez por mim.

A todos do laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica. Especialmente à Fran, por me apresentar o fantástico e frustrante mundo da biologia molecular. Obrigada por toda ajuda, prestatividade, amizade e companheirismo durante as extensas pipetagens exigidas nos ensaios. Agradeço também ao professor Ricardo Titze por toda sua colaboração para este trabalho, e por toda a paciência em discutir e analisar comigo os resultados de RT-qPCR.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho!

RESUMO

O Citrato de Ródio (CR) é um complexo metálico que apresenta significativa atividade citotóxica, citostática e antitumoral em células de carcinoma mamário humano. Em estudos prévios conduzidos por Carneiro (2011) foi observado que o CR induziu redução de filamentos de actina em células de adenocarcinoma mamário humano (linhagem MCF-7). A actina é uma proteína componente do citoesqueleto dos eucariontes e desempenha funções relevantes na dinâmica celular, tais como, manutenção da morfologia, mitose, regulação da sinalização para sobrevivência e aumento da sensibilidade celular à indução de apoptose quando esta proteína fica agregada em virtude da sua despolimerização. Visando compreender melhor a atuação do CR sobre a actina, o presente estudo avaliou em ensaio-piloto a expressão gênica de γ -actina em cultura de células saudáveis e em células de adenocarcinoma mamário humano por meio de RT-qPCR. O tratamento das células com CR causou efeito citotóxico dose-dependente sobre a viabilidade e morfologia celular e tendência na redução da expressão relativa de γ -actina. Os resultados do atual estudo foram de fundamental importância para se compreender a provável correlação entre o efeito citotóxico do CR e sua atuação sobre os filamentos de actina. Além disso, com este estudo será possível dar continuidade às investigações que permitirão novas abordagens e perspectivas relacionadas à dinâmica de regulação da despolimerização da actina mediada por outras proteínas citosólicas e por microRNAs.

Palavras-Chave: citrato de ródio, actina, câncer de mama, expressão gênica, citotoxicidade.

ABSTRACT

The Rhodium Citrate (RC) is a metal complex that exhibits significant cytotoxic, cytostatic and antitumor activity in human mammary carcinoma cells. In previous studies led by Carneiro (2011), it was observed that RC induced the actin filaments reduction in human mammary adenocarcinoma cells (MCF-7 cell line). Actin is a eukaryotic cytoskeletal protein which performs important roles in cell dynamics such as morphology, mitosis, regulation of survival signaling, and the increased of cell sensitivity due to apoptosis induction when aggregated because of its depolymerization. To better understand the RC activity on actin dynamic, the current study evaluated in pilot-assay the gene expression of γ -actin in healthy cells and in human mammary adenocarcinoma cells by RT-qPCR in *in vitro* pattern. The treatment with RC caused a dose-dependent cytotoxic effect on cell viability and morphology, and a reduction tendency of relative expression of γ -actin. The results were extremely important to understand the likely correlation between the RC cytotoxic effect and its activity on the actin filaments. In addition, this study will allow new investigations and approaches related to the regulation of actin depolymerization mediated by other cytosolic proteins and by microRNAs.

Key-words: rhodium citrate, actin, breast cancer, gene expression, cytotoxicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo Geral	9
3.2. Objetivo Específicos	9
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
4.1. Câncer de mama	10
4.2. Limitações no tratamento do câncer de mama	12
4.3. Citrato de Ródio	13
4.4. Actina	15
5. MATERIAIS E MÉTODOS	17
5.1. Condições de Cultura Celular	17
5.2. Tratamento das células com Citrato de Ródio (CR) e Paclitaxel (PTX)	18
5.3. Ensaio de viabilidade celular por MTT e análise da morfologia celular por microscopia	18
5.4. Extração e Quantificação de RNA total	19
5.5. Transcrição reversa (RT) para síntese do DNA complementar (cDNA)	19
5.6. Amplificação e quantificação de γ -actina por qPCR	19
5.7. Análise estatística	20
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
6.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT	21
6.2. Análise da morfologia celular	22
6.3. Análise da expressão relativa de γ -actina induzida por Citrato de Ródio	23
7. CONCLUSÕES	25
8. PERSPECTIVAS	26
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

O câncer, é definido como um conjunto de doenças originadas por mutações no DNA da célula que se revertem em alterações nos mecanismos de reparo do DNA e resistência à morte celular por apoptose, resultando no crescimento desordenado de células cancerosas no organismo e possibilitando muitas vezes em migrações para outros tecidos do corpo, definindo uma característica metastática, como é o caso do câncer de mama (Grivicich *et al*, 2007; INCA 2017).

O câncer de mama é o segundo mais frequente no mundo, representando cerca de 28% dos novos casos a cada ano, sendo mais comum na população feminina com uma incidência progressiva especialmente após os 50 anos de idade. De acordo com estatísticas do Instituto Nacional do Câncer, 57.960 novos casos foram registrados no Brasil em 2016 (INCA, 2017). Atualmente as alternativas terapêuticas para o tratamento das células de adenocarcinoma mamário humano presentes no mercado, consistem em tratamentos locais (cirurgia e radioterapia) e tratamentos sistêmicos, tais como a quimioterapia, imunoterapia e hormonioterapia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). No entanto, tais tratamentos atingem muitas vezes não somente as células cancerosas, mas também as células normais, provocando efeitos adversos aos pacientes. Além disso, são ineficazes se a doença não for diagnosticada precocemente. No intuito de elaborar alternativas terapêuticas mais eficientes contra o câncer e, ao mesmo tempo, menos invasivas aos pacientes, cientistas buscam desenvolver novos fármacos antitumorais como o uso terapêutico de metais ou complexos metálicos tais como o Citrato de Ródio (CR). O CR é um dos carboxilatos de ródio mais promissores por já ter apresentado potencial atividade citotóxica e antitumoral (Katsaros & Anagnostopolou, 2002). Em estudos prévios, conduzidos por Carneiro (2011), foi observado que o CR induziu relevante alteração morfológica em células de adenocarcinoma mamário humano (linhagem MCF-7) associada às alterações estruturais nos filamentos de actina.

A actina identificada nas isoformas β e γ compõe o citoesqueleto dos eucariontes e é uma proteína essencial para estabelecer a forma e a motilidade da célula (Gourlay *et al*, 2005; De Robertis, 2006). Há evidências de que a actina despolimerizada desempenha um importante papel na abertura de canais iônicos na mitocôndria que regulam a apoptose (Xu, Forbes & Colombini, 2001). Dessa forma, a agregação de actina, que ocorre em virtude da sua despolimerização, está correlacionada com o aumento da sensibilidade celular à indução de

apoptose. Com isso, é possível que um dos fatores associados à citotoxicidade de citrato de ródio, identificada previamente por Carneiro (2011) em células da linhagem MCF-7, possa estar relacionado a uma modulação negativa da expressão de actina uma vez que células tumorais podem apresentar mudanças na expressão gênica de determinadas proteínas que regulam a sobrevivência celular. Além disso, a modulação negativa de actina pode ocasionar mudanças na expressão de microRNAs (miRNA), que podem atuar como oncogenes ou supressores tumorais contribuindo para o crescimento tumoral e metástase (Melo & Esteller, 2011; Valastyan, 2012; Zhang & Ma, 2012).

No cenário evidenciado por estudos prévios, este trabalho, apresenta uma análise inicial da expressão relativa de γ -actina induzida por citrato de ródio pelo método de qPCR em tempo real, em células saudáveis epiteliais de mama e em células de adenocarcinoma mamário humano. Também foi constatada a atividade citotóxica do citrato de ródio pelo ensaio de viabilidade celular por MTT e por imagens obtidas por microscopia óptica.

2. JUSTIFICATIVA

A análise dos efeitos do citrato de ródio sobre a expressão de actina faz parte de uma etapa fundamental para se estabelecer uma possível correlação entre sua citotoxicidade e sua atuação nos microfilamentos de actina que são de extrema importância no fuso mitótico e conseqüentemente na proliferação de células tumorais. A partir deste conhecimento, será possível identificar alvos para inibir o progresso de células cancerosas bem como aprimorar as aplicações biotecnológicas do citrato de ródio como um candidato promissor para emprego quimioterápico no tratamento do câncer, favorecendo sua eficácia citotóxica e antitumoral.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo confirmar os efeitos citotóxicos e avaliar a ação do citrato de ródio na indução da modulação negativa da expressão gênica de γ -actina em células saudáveis de origem mamária e em células de adenocarcinoma mamário em modelos *in vitro*.

3.2 Objetivo Específicos

Confirmar a indução do Citrato de Ródio na (s):

- Citotoxicidade em células de carcinoma mamário humano (MCF-7 e MDA-MB-231) e epiteliais da mama normais (MCF-10A), por meio de análises de viabilidade celular;
- Alterações morfológicas em cultura de células de carcinoma mamário humano (MCF-7 e MDA-MB-231) e epiteliais da mama normais (MCF-10A), por meio de microscopia de óptica.

Avaliar a ação do citrato de ródio na:

- Inibição da expressão gênica da proteína γ -actina (gene ACTG1) em células de carcinoma mamário e células sadias por meio de RT q-PCR;

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1. Câncer de mama

O câncer de mama, é o segundo carcinoma mais frequente e o mais comum entre as mulheres no mundo, representando cerca de 28% dos novos casos a cada ano. Estatísticas apontam sua infrequência antes dos 35 e uma progressiva incidência após os 50 anos de idade (INCA, 2017).

Os fatores de risco da doença são originados por várias vias e aumentam com problemas endócrinos e/ou de contexto reprodutivo da mulher (menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, uso de contraceptivos e reposição hormonal), ou com condições relacionadas ao hábito de vida (sobrepeso, ingestão de bebidas alcoólicas, sedentarismo, etc) e fatores ambientais, como por exemplo a exposição intensa à radiação ionizante ou a agentes carcinogênicos (Sharma *et al*, 2010; INCA, 2017). A presença de fatores genéticos e/ou hereditários relacionados com mutações em genes supressores de tumor tais como o BRCA1 e BRCA2, corresponde entre cerca de 5 e 10% de todos os casos de câncer de mama, incluindo o desenvolvimento da doença sobretudo em idade jovem e em homens (Amendola & Vieira, 2005).

As sucessivas alterações originadas pelo crescimento descontrolado nas células resultam em diferentes tipos de câncer de mama. A maioria dos cânceres de mama são denominados adenocarcinomas, ou seja, tem origem nas células epiteliais de revestimento interno e externo e apresentam alterações no padrão de crescimento glandular. Os tipos mais frequentes de adenocarcinoma mamário podem ser originados nas células dos ductos mamários ou nas glândulas produtoras de leite (lóbulos), caracterizando respectivamente o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e o carcinoma lobular *in situ* (CLIS) (Figura 1). A capacidade de se espalhar para outras partes do corpo ou invadir o tecido circundante define o tipo invasivo ou metastático do carcinoma mamário (Figura 2), que também pode ter origem ductal ou lobular (Sharma *et al*, 2010; American Cancer Society, 2017).

O deslocamento das células cancerosas para outras partes do corpo depende do potencial metastático e do nível de agressividade do tumor onde originalmente ele se desenvolveu. Geralmente se deslocam através da corrente sanguínea ou do sistema linfático para os ossos, pulmões, cérebro e fígado, e conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos e órgãos invadidos vão perdendo suas funções (Wang *et al*, 2017). O nível de malignidade depende da quantidade e da condição de hormônios e promotores de crescimento ao qual a neoplasia é dependente para se desenvolver. Existem três principais biomarcadores

que definem o potencial de desenvolvimento e invasibilidade do câncer de mama: receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) e do promotor de crescimento HER2. O resultado (positivo ou negativo) do teste para essas proteínas são fundamentais para a decisão do tratamento mais promissor para a doença. Usualmente, tumores testados como triplo-positivos são tratados com drogas hormonais e drogas que possuem como alvo o promotor de crescimento HER2. O câncer de mama diagnosticado como triplo-negativo não depende dessas proteínas para sua proliferação. Logo, os tratamentos baseados em hormonioterapia e em quimioterapia, que tem como alvo o HER2, não são eficazes. Esse subtipo de câncer de mama cresce e se espalha mais rapidamente do que a maioria dos outros subtipos (American Cancer Society, 2017; Duffy et al, 2017).

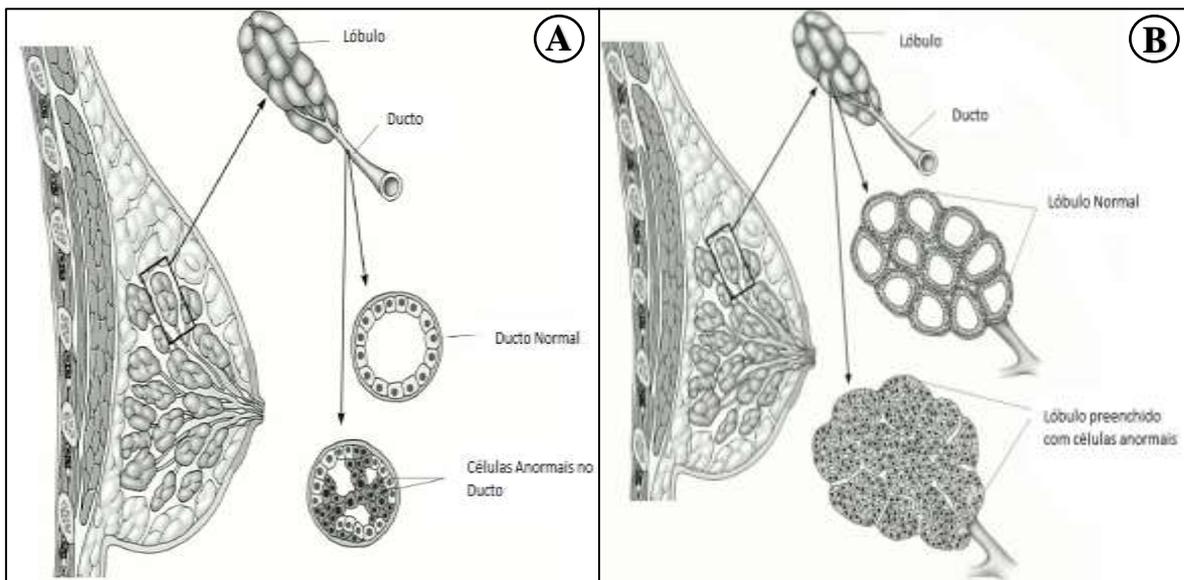


Figura 1. Tipos mais frequentes de adenocarcinoma mamário humano. (A) Carcinoma ductal *in situ* (CDIS). (B) carcinoma lobular *in situ* (CLIS). Adaptado de American Cancer Society, 2017.

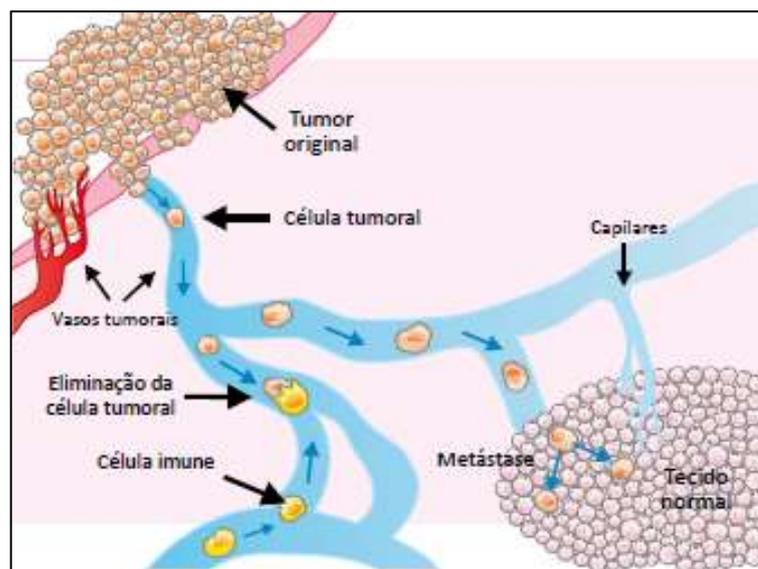


Figura 2. Processo de formação de metástase no organismo. A metástase ocorre quando as células cancerosas invadem o tecido circundante ou migram para outras partes do corpo a partir da corrente sanguínea ou do sistema linfático. ABC do câncer, 2012.

4.2.Limitações no tratamento do câncer de mama

O tratamento para o câncer é uma variável dependente de fatores tais como o tipo, localização, nível de estadiamento da doença no organismo, além da condição de saúde e idade do paciente. As modalidades terapêuticas comumente empregadas para o câncer de mama consistem em tratamentos sistêmicos tais como quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia e tratamentos loco-regionais, como é o caso das cirurgias e radioterapia. A maioria desses tratamentos são projetados para matar diretamente ou para levar a eventual morte das células cancerosas privando-as por diversos mecanismos de sinais necessários para a sua sobrevivência; porém, se tornam menos eficazes quando a doença não é detectada precocemente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Uma das grandes limitações na terapêutica sistêmica contra o câncer de mama é a redução dos efeitos adversos ocasionados pela alta toxicidade e baixa especificidade dos quimioterápicos, que não se acumulam seletivamente no tecido tumoral e agem tanto nas células tumorais quanto nas células saudáveis do organismo, resultando em perda de cabelo, náuseas, fadiga e danos à qualidade de vida do paciente (Aslam *et al*, 2014). Além disso, uma das características do câncer é um aumento na instabilidade genética e nas taxas de mutação. Dessa forma, podem existir no tumor, populações de células cancerosas que são sensíveis e outras que podem desenvolver resistência ao tratamento (Weinberg, 2013). Quando expostas a um quimioterápico, as células que são sensíveis aos efeitos da droga são mortas. Porém, aquelas

que são resistentes sobreviverão e se multiplicarão, resultando em uma reincidência do tumor e em um comprometimento da atividade quimioterápica em uma grande proporção de células tumorais resistentes (Weinberg, 2013; Chaves, 2017). Um exemplo desse fato é o que ocorre na terapia com o paclitaxel (droga da família dos taxanos) na linhagem celular triplo-negativa de câncer de mama MDA-MB-231, que é insensível à apoptose induzida por este fármaco (Flores et al, 2012).

No intuito de minimizar os fatores limitantes para o tratamento do câncer de mama, cientistas buscam novas abordagens terapêuticas que sejam mais seletivas às células cancerosas, tragam menos efeitos adversos à qualidade de vida do paciente e que eliminem ou diminuam as chances de reincidência do tumor. Nesse cenário estão envolvidos o uso de complexos metálicos como agentes antitumorais, os sistemas de entrega (*delivery*) de fármaco por nanopartículas e o uso da terapia gênica com microRNAs (Katsaros & Anagnostopoulou, 2002; Azzawi, 2016; Weindan, 2017).

4.3. Citrato de Ródio

Baseando-se nos resultados obtidos da excelente atividade antitumoral e citostática da cisplatina para o tratamento de carcinomas sólidos, vários estudos foram feitos a fim de se desenvolver compostos metálicos análogos que apresentassem menor toxicidade sistêmica no organismo e, com isso, menor ocorrência dos efeitos adversos e da quimioresistência apresentada pelas células tumorais (Katsaros & Anagnostopoulou, 2002; Rafique et al, 2010).

Dentre os compostos metálicos análogos à cisplatina, os carboxilatos de ródio (fórmula geral $[Rh_2(O_2CR)_4]$), que foram inicialmente sintetizados e caracterizados na década de 1970, se apresentam como um grupo altamente promissor por já ter apresentado, em estudos pioneiros *in vivo* e *in vitro*, elevada atividade citostática e antitumoral em vários modelos de carcinoma, entre eles, sarcoma 180 e P388, melanoma B16 e carcinoma ascítico de Ehrlich. Porém, a elevada toxicidade e baixa solubilidade dos primeiros carboxilatos de ródio a terem seus efeitos biológicos testados (da série acetato, butirato, propionato e pentanoato), impediu avanços em testes clínicos. Na tentativa de diminuir o efeito citotóxico sistêmico e o caráter hidrofóbico de carboxilatos de ródio, o citrato de ródio (Figura 3) foi sintetizado a partir de estratégias adotadas para a obtenção desses complexos com ligantes mais hidrossolúveis como por exemplo o citrato que se mostrou promissor para a quimioterapia do câncer por apresentar uma menor toxicidade

para as células normais, quando comparados aos outros compostos de ródio (Katsaros & Anagnostopoulou, 2002; Nunes, 2010)

Apesar da promissora atividade citotóxica e antitumoral apresentada pelo citrato de ródio, poucos estudos têm sido realizados para explorar seu potencial e pouco se sabe sobre sua atividade biológica no organismo. Estudos conduzidos por Carneiro (2011) mostraram que o tratamento com citrato de ródio em células de adenocarcinoma mamário humano induziu uma redução qualitativa expressiva nos filamentos de actina (Figura 4). Estudos posteriores realizados por Chaves (2013 e 2017) mostraram que o citrato de ródio associado à nanopartículas induz alterações morfológicas, fragmentação e inibição da síntese de DNA, características da apoptose celular.

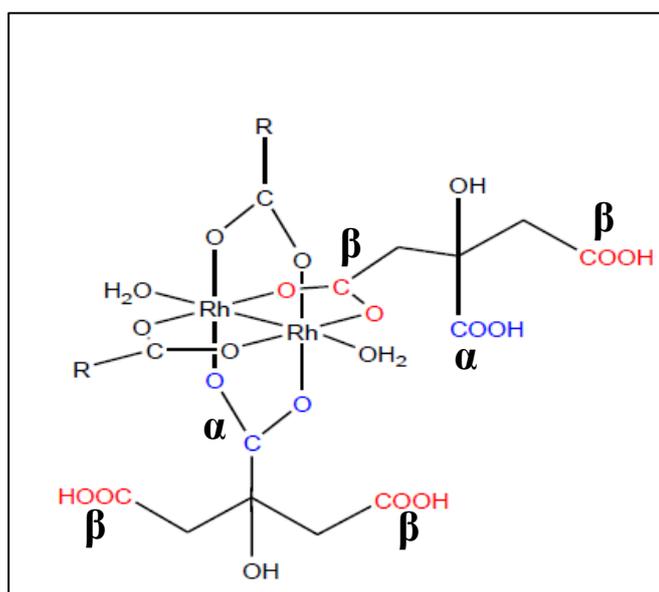


Figura 3. Estrutura molecular geral do citrato de ródio. Na representação pode ser visualizada a coordenação com o centro dimetálico de ródio com os grupos (α e β) de ácido cítrico. Adaptado de Carneiro, 2011.

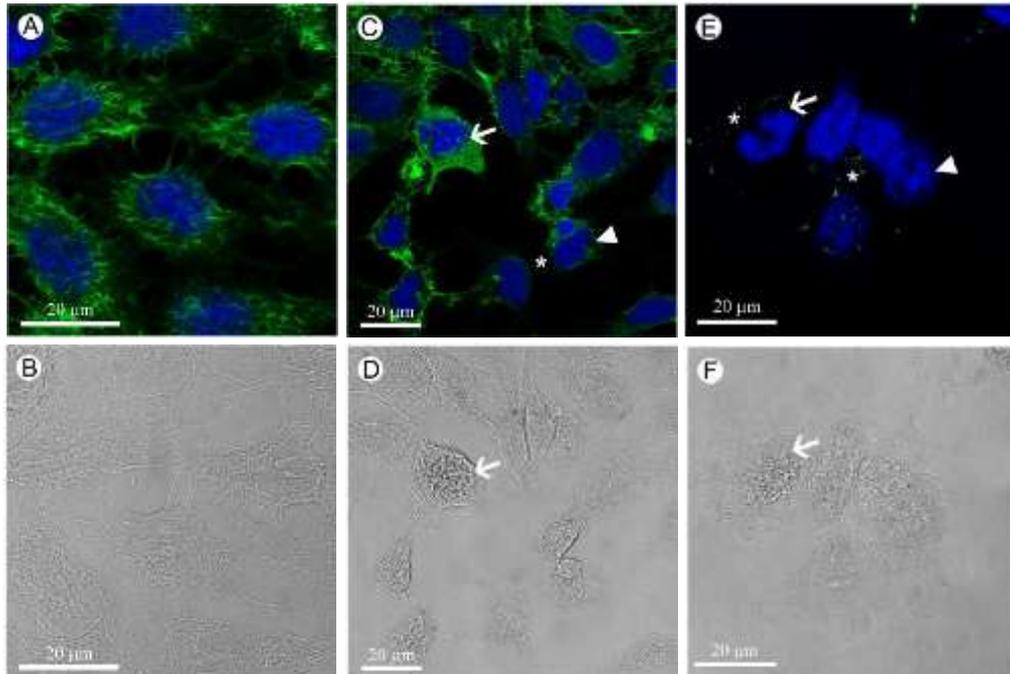


Figura 4. Fragmentação nuclear e redução de filamentos de actina em células de adenocarcinoma mamário (linhagem MCF-7) induzidas por citrato de ródio livre após tratamento de 48 horas. As células foram marcadas com os fluorocromos DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindole) para visualização do núcleo e com o Faloidina-Alexa Fluor 488 para visualização de actina. (A, B) Controle negativo (células sem tratamento); (C, D) Células tratadas com 50 μM de citrato de ródio. (E, F) Células tratadas com 500 μM de citrato de ródio. Setas e cabeças de setas indicam fragmentação nuclear e condensação da cromatina, respectivamente. A redução dos filamentos de actina é representada por asteriscos (*). Adaptado de Carneiro, 2011.

4.4. Actina

A actina é a proteína globular mais abundante nas células dos mamíferos. Ela é responsável pela formação de pequenas estruturas citoplasmáticas filamentosas (microfilamentos) que apresentam função estrutural, de contração e de movimentação celular. Codificada por genes independentes, a actina é identificada em três principais isoformas: α -actina, β -actina e γ -actina; sendo que β -actina e γ -actina coexistem como componentes do citoesqueleto e contribuem para estabelecer a forma e a motilidade das células não-musculares dos eucariontes, enquanto a α -actina está presente em células musculares com função contrátil (De Robertis, 2006).

A actina atua como via transportadora de organelas pelo citoplasma e desempenha funções relevantes na dinâmica celular tais como manutenção da morfologia, mitose e regulação da sinalização para sobrevivência (Gourlay *et al*, 2005; De Robertis, 2006). Estudos mostram que alterações na estrutura e organização da actina no citoesqueleto tem relação com eventos de regulação e diferenciação celular que podem desencadear a formação de neoplasia e progressão

da capacidade de invasão das células cancerosas (metástase) no organismo (Rao e Cohen, 1991).

A organização dos filamentos de actina é um processo dinâmico de polimerização e despolimerização que origina grandes alterações na estrutura de uma célula. Essa disposição não estática dos microfilamentos de actina e de outras estruturas de proteínas constituintes do citoesqueleto da célula, tal como os microtúbulos, é um fato em que se baseiam algumas drogas antimitóticas no tratamento contra o câncer, dificultando a polimerização dos monômeros e a formação do fuso mitótico impedindo, assim, a divisão celular (Rao e Cohen, 1991, Rang *et al*, 2011). Esse evento também é mediado por um amplo espectro de interações com proteínas da matriz extracelular, membranas de superfície celular, enzimas citoplasmáticas e até mesmo o núcleo da célula (Lodish *et al*, 2000). O fato dessas interações ocorrerem com proteínas que regulam sinais de morte celular (apoptose), é um evento altamente promissor para ser utilizado como alvo terapêutico para tratamento de câncer (Jordan & Wilson, 1998).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Condições de Cultura Celular

As duas linhagens celulares tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) utilizadas no presente estudo, foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células saudáveis epiteliais de mama foram cedidas pelo Laboratório de Morfologia da Universidade de Brasília. Todas as linhagens foram mantidas em frascos de cultura (totalmente fechados para a linhagem MDA-MB-231) com meio de cultivo em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. As células de adenocarcinoma mamário humano das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram mantidas respectivamente com meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (GIBCO™, Carlsbad, CA, EUA.) e L-15 (*Leibovitz*) (Sigma®, St. Louis, MO, EUA), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina, e 1mM de piruvato (somente em RPMI), obtidos pela empresa GIBCO™. As células da linhagem MCF-10A foram cultivadas em meio *Dulbecos's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F-12* (DMEM/F-12) na proporção de 1:1; suplementado com 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal humano (EFG) (Sigma®), 100 ng/mL de toxina colérica (Sigma®); 1 mg/mL de insulina *animal origin free* (AOF) (GIBCO™), 500 ng/mL de hidrocortisona (Sigma®) e 10% de soro fetal equino inativado (SFE) (Sigma®).

Para o acompanhamento da taxa de crescimento, as células foram visualizadas em microscópio óptico invertido (Axio Vert. A1, Zeiss). Cultivos celulares com mais de 70% de confluência foram submetidos a passagens (repiques) para realização dos experimentos. Assim, os frascos com cultivo celular eram lavados com *Phosphate-Buffered Saline* (PBS 1x, GIBCO™), e os repiques das células realizados por meio da ação proteolítica de solução 0,25% de tripsina-EDTA (GIBCO™) com incubação entre 3 a 7 minutos a 37°C. A seguir, a ação enzimática era neutralizada pela ressuspensão das células em meio de cultura. A quantificação do número de células para os experimentos foi realizada por meio de contagem direta em Câmara de Neubauer, com auxílio do método de exclusão pelo corante Azul de Tripán (GIBCO™).

5.2. Tratamento das células com Citrato de Ródio (CR) e Paclitaxel (PTX)

O complexo de Citrato de Ródio (CR) foi sintetizado e cedido pelo Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG). O Paclitaxel (Accord Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil), cedido pela farmácia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), foi escolhido como controle positivo para o presente estudo por se tratar de um quimioterápico empregado na terapêutica clínica de câncer de mama e também por apresentar mecanismo de ação no citoesqueleto celular. As concentrações das soluções estoques utilizadas no estudo foram de 18,8 mM para o CR e 7,0 mM para o PTX. Para ensaios de viabilidade celular por MTT, as células foram semeadas (3×10^3 para MCF-7 e MCF-10A, e 5×10^3 para MDA-MB-231) em placas de 96 poços e, para obtenção de imagem da morfologia celular por microscópio óptico invertido, as células foram semeadas (1×10^5) em placas de 12 poços. Após 24h as três linhagens foram tratadas por 48 horas com 50, 150, 250, 500 e 750 μM de CR; 50 nM de PTX (controle positivo) ou mantidas somente com meio de cultivo (controle negativo, células não tratadas). Para ensaios de RT-qPCR, as células foram cultivadas em placas de seis poços com densidade inicial de 5×10^5 e após 24 h foram tratadas com doses de 250 e 500 μM de CR ou mantidas em meio de cultura por 48 h (n=3 para cada grupo experimental).

5.3. Ensaio de viabilidade celular por MTT e análise da morfologia celular por microscopia

A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Após cada tratamento experimental, o meio de cultura de cada poço foi substituído por uma solução de meio contendo 0,5 mg/mL de MTT e mantido por 4 h a 37 °C. Em seguida, o meio com MTT foi removido e 200 μL de DMSO (Sigma®) foram adicionados a cada poço, para solubilização dos cristais de formazan formados. A quantificação dos cristais formados foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax® M2, Molecular Devices, California, EUA), calibrado para leitura no comprimento de onda de 595 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os valores de absorbância obtidos foram considerados proporcionais ao número de células viáveis ao final do experimento, normalizados com o controle negativo e convertidos para percentual. Desta maneira, o grupo sem tratamento (controle negativo) foi definido como 100% de viabilidade, para fins de comparação. Foi utilizado um controle de DMSO (branco) em poços sem células para descartar a possibilidade de interferência desse reagente na análise.

A análise da morfologia celular foi realizada após tratamento com PTX (50nM) e CR (250 e 500 μM) por 48 h e as imagens foram obtidas por meio de microscópio de luz invertido

(Axio vert 100, Zeiss, Alemanha) com o auxílio do programa de captura de imagens *AxioVision LE*.

5.4.Extração e Quantificação de RNA total

A extração de RNA das células foi realizada através de *pellet* obtido das linhagens celulares e utilizando o kit comercial *MirVana*TM (Ambion[®] by life technologiesTM, EUA), com base nas instruções do fabricante e posteriormente estocadas a -20°C até o momento de uso. O RNA foi quantificado por fluorimetria, utilizando-se o equipamento Qubit[®] 2.0 *Fluorometer* (Invitrogen, Califórnia, EUA) e kit de quantificação para RNA total (Qubit[®] RNA BR *Assay Kit*) (Molecular Probes[®] by life technologiesTM, EUA).

5.5.Transcrição reversa (RT) para síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 100 ng de RNA total. Utilizou-se o sistema de *random primers* do kit comercial *GoScript*TM *Reverse Transcription System* (Promega, Wisconsin, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após a transcrição reversa, as amostras de cDNA foram mantidas na temperatura de -20°C até o momento do ensaio de qPCR.

5.6.Amplificação e quantificação de γ -actina por qPCR

Na reação de qPCR em tempo real (real time quantitative Polymerase Chain Reaction) foram utilizados *primers* específicos para a sequência do RNA mensageiro (RNAm) de γ -actina humano (ACTG-1) e *primers* para o controle endógeno (*house keep gene*). Os *primers forward* e *reverse* para γ -actina foram 5'-TCGCCGATCGCAATGGAAGAAG-3' e Anti-sense: 5'-ACGCAGCTCATTGTAGAAGGTGTGG-3', respectivamente (Sun, 2007) (Sigma[®]). Para o gene endógeno, utilizou-se como alvo o RNAm de glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), *forward* 5'-CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT-3' e *reverse* 5'-CCATGGTGTCTGAGCGATGT-3' (Shaverdashvili *et al*, 2015) (Sigma[®]). A reação foi realizada em termociclador *QuantStudio*TM *12K Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Califórnia, USA). Os produtos de amplificação foram detectados por meio do corante fluorescente intercalante Fast SYBRTM Green Master Mix (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. As condições experimentais da qPCR foram de 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial) seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 60 segundos (desnaturação) e 60°C por 60 segundos (anelamento e extensão). Cada amostra foi realizada em triplicata e no ensaio também foi

incluído um controle negativo (*non-template control*, NTC) para monitorar possível contaminação de primer e impedir resultados falso-positivos. O método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Figura 5), que é uma análise comparativa do material genético do alvo com um controle interno normalizado com um gene de referência/controlado endógeno (*housekeeping gene*), foi utilizado para expressar os efeitos do CR no conteúdo do RNAm de γ -actina.

$$\begin{aligned}\Delta C_T &= \Delta C_{T,\text{alvo}} - \Delta C_{T,\text{referência}} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_{T,\text{amostra}} - \Delta C_{T,\text{controle}} \\ \text{Expressão Relativa} &= 2^{-\Delta\Delta C_T}\end{aligned}$$

Figura 5. Fórmula logarítmica de quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O C_t é o ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção (*threshold*) que é o nível de fluorescência onde a reação é detectada durante a fase de exponencial como uma linha de comparação entre as amostras. O resultado dessa fórmula demonstra quantas vezes o gene de interesse foi mais ou menos expressado no tratamento do que no controle.

5.7. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância one-way (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey ou Student's T-test, no programa estatístico *GraphPad Prism* (versão 7.0). Foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$. A expressão relativa de C_t (*threshold cycle*) foi calculada pelo método logaritmo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (expressão relativa normalizada pelo controle endógeno GAPDH (ΔC_t) e pela expressão do grupo não tratado (NT) ($\Delta\Delta C_t$), considerado como 1,0 (100% de expressão).

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT

O efeito citotóxico do CR foi proporcional ao aumento das doses e similar entre as linhagens tumorais (Figura 6), especialmente acima de 500 μ M. Contudo, observou-se distinta sensibilidade ao CR entre as linhagens tumorais e a linhagem saudável (MCF-10A). Foi observado que somente doses acima de 500 μ M de CR foram significativamente citotóxicas para MCF-10A (Figura 7). O tratamento com PTX, fármaco comercialmente utilizado em terapias para o câncer de mama avançado (metástase) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017), não induziu redução significativa na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 (célula triplo-negativa com maior capacidade metastática em relação à MCF-7). Contudo, este fármaco reduziu mais de 50% da viabilidade das células sadias do epitélio de mama (MCF-10A), o que nos permite salientar a falta de especificidade deste quimioterápico, empregado comercialmente, à determinados tipos de células tumorais e, conseqüentemente, a necessidade de tratamentos alternativos, menos invasivos e mais eficazes no tratamento do câncer.

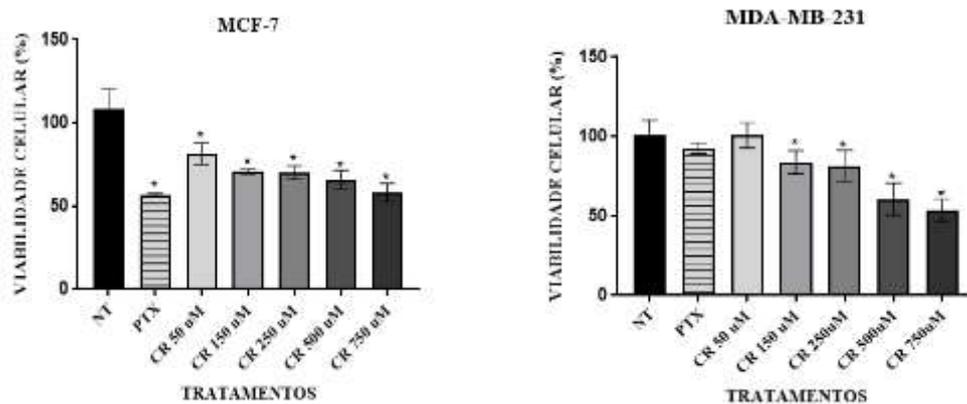


Figura 6. Viabilidade celular após tratamento por 48 h com citrato de ródio (CR) e paclitaxel (PTX) nas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231. A viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os grupos experimentais foram analisados em triplicatas em, pelo menos, três ensaios independentes. Os resultados da viabilidade foram calculados com base no percentual dos valores de absorvância observados no grupo controle não tratado (NT). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância *one-way* (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey por meio do programa *GraphPad Prism* (versão 7.0). * $p < 0,05$ comparados ao controle não-tratado.

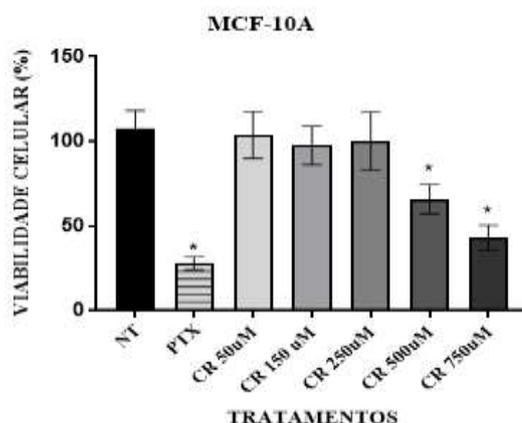


Figura 7. Viabilidade celular após tratamento por 48h com citrato de ródio (CR) e paclitaxel (PTX) na linhagem não-tumoral (MCF-10A). A viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os grupos experimentais foram analisados em triplicatas em, pelo menos, três ensaios independentes. Os resultados da viabilidade foram calculados com base no percentual dos valores de absorbância observados no grupo controle não tratado (NT). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância *one-way* (ANOVA), seguido do pós-teste de *Tukey* por meio do programa GraphPad Prism (versão 7.0). * $p < 0,05$ comparados ao controle não-tratado.

6.2. Análise da morfologia celular

Os tratamentos com CR (250 e 500 μ M) e PTX (50 nM) foram capazes de produzir alterações morfológicas pronunciadas nas três linhagens celulares estudadas após 48 horas de tratamento. As alterações notadas são peculiares à citotoxicidade: redução do tamanho das células, morfologia arredondada, presença de vacúolos, ausência de pontos de adesão focal e uma redução do número de células aderidas à superfície da placa (Figura 8 e 9).

Normalmente, alterações no citoesqueleto podem estar associadas a processos apoptóticos em células eucarióticas. A apoptose é um evento de morte celular almejado na prospecção de quimioterápicos visto que não desencadeia processos inflamatórios como é o caso da necrose (RONINSON et al., 2001).

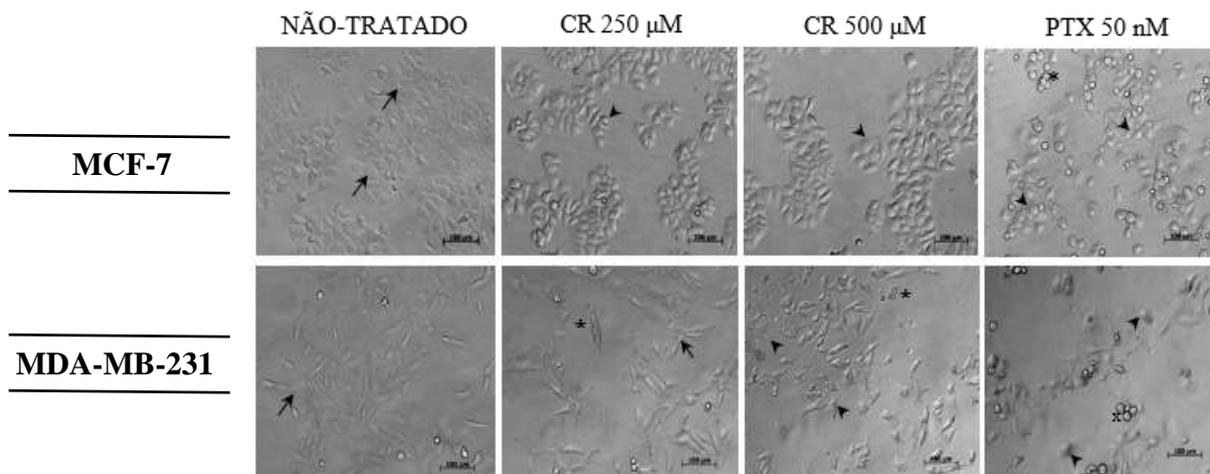


Figura 8. Alterações morfológicas em células das linhagens MFC-7 e MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento com citrato de ródio (CR) e paclitaxel (PTX). As Células foram tratadas com concentração de 250 e 500 μ M de CR, 50 nM de PTX, ou não tratadas. **Legenda:** células com morfologia normal (seta), arredondadas (cabeças de setas), células inviáveis em suspensão (letra x), formação de vacúolos (asterisco), após tratamento com os compostos. As imagens foram obtidas por meio de microscópio de luz invertido. Barra de referência: 100 μ m.

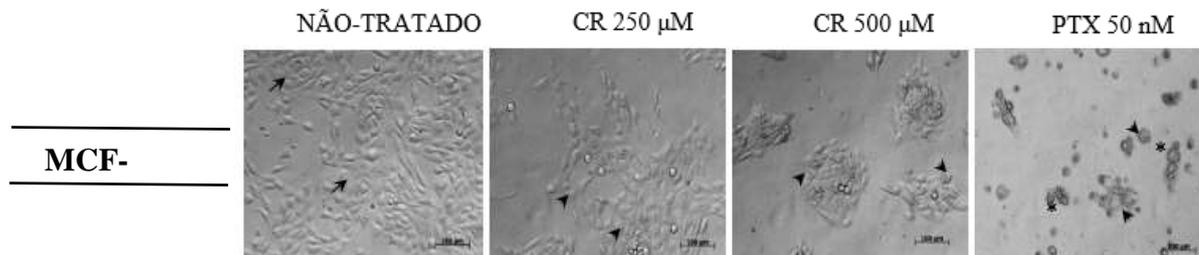


Figura 9. Alterações morfológicas em células da linhagem MFC-10A após 48 horas de tratamento com citrato de ródio (CR) e paclitaxel (PTX). As Células foram tratadas com concentração de 250 e 500 μ M de CR, 50 nM de PTX, ou não tratadas. **Legenda:** células com morfologia normal (seta), arredondadas (cabeças de setas), células inviáveis em suspensão (letra x), formação de vacúolos (asterisco), após tratamento com os compostos. As imagens foram obtidas por meio de microscópio de luz invertido. Barra de referência: 100 μ m.

6.3. Análise da expressão relativa de γ -actina induzida por Citrato de Ródio

Foi feito um ensaio piloto (n=3) de qPCR para análise da quantificação relativa de γ -actina induzida por CR nas doses de 250 e 500 μ M. Para linhagem tumoral MCF-7 e para a linhagem sadia do epitélio de mama MCF-10A, apesar de apresentarem tendência na redução da expressão de γ -actina, não foi possível obter dados conclusivos em virtude da ocorrência de variações no controle endógeno observadas entre os tratamentos.

Notou-se na linhagem tumoral triplo-negativa, MDA-MB-231, (análises realizadas com n=3) diminuição de 0,8 ($\pm 0,07$) e 0,6 ($\pm 0,02$) no conteúdo de γ -actina em relação às doses de 250 e 500 μ M de CR. Apesar da redução da expressão gênica não ter sido significativa entre os tratamentos (p=0,12), acredita-se que a redução apresentada na expressão relativa de γ -actina tem relevância biológica e que há uma tendência de efeito dose-dependente (Figura 10).

Estudos recentes mostram que várias proteínas importantes que medeiam as vias de sinalização e que ligam os sinais migratórios ao citoesqueleto de actina estão reguladas positivamente (super expressas) em vários tipos de células cancerosas metastáticas (Yamaguchi & Condeelis, 2007). A diminuição apresentada na expressão de γ -actina pode ser um fator desfavorável para que essas interações ocorram e por isso é evento altamente promissor para ser utilizado como alvo terapêutico para tratamento de câncer.

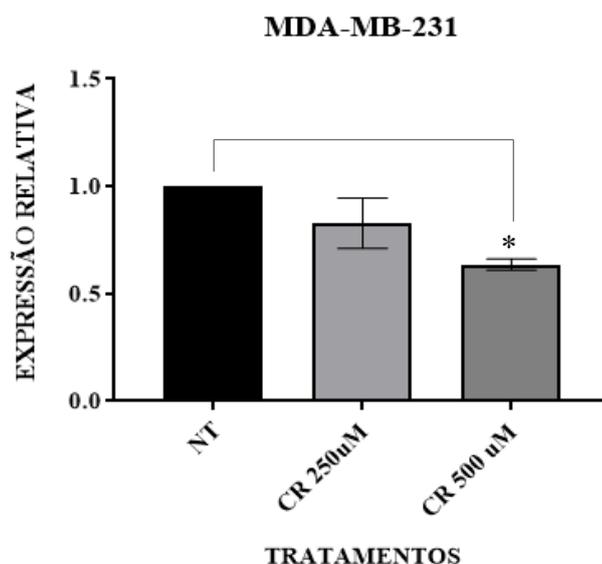


Figura 10. Expressão relativa de γ -actina pelo método qPCR em tempo real em células tumorais da linhagem MDA-MB-231. A expressão foi normalizada pelo controle endógeno GAPDH (Δ Ct) e pela expressão do grupo não tratado (NT) ($\Delta\Delta$ Ct), arbitrariamente considerado como 1,0 (100% de expressão). Quantificação relativa de Ct (*threshold cycle*) calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta$ Ct. n=3, p=0,12, *Student's T-test* (CR 250 μ M versus CR 500 μ M).

Para um melhor entendimento dos resultados e precisão estatística da expressão relativa de γ -actina nas três linhagens investigadas no presente estudo, se faz necessária a repetição dos ensaios para confirmação dos resultados obtidos na linhagem MDA-MB-231, bem como um maior número amostral ($n \geq 6$) para atestar o efeito dose-dependente entre os tratamentos. Também será importante uma melhor investigação para escolha de outro controle endógeno

(*house keep gene*) para normalização da expressão de γ -actina, uma vez que o controle endógeno utilizado (GAPDH) apresentou instabilidade nas linhagens MCF-7 e MCF-10A.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- O CR induziu citotoxicidade distinta e de maneira dose-dependente entre as linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) e a linhagem saudável (MCF-10A). A linhagem MCF-7 se apresentou mais sensível ao tratamento, com redução significativa de viabilidade a partir de 50 μ M. Somente doses acima de 500 μ M de CR foram significativamente citotóxicas para a linhagem MCF-10A.
- O CR induziu alterações morfológicas em cultura de células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7 e MDA-MB-231) e em células sadias do epitélio da mama (MCF-10A). Os aspectos morfológicos característicos de eventos associados à apoptose celular, corroboram com o efeito citotóxico do CR visto em estudos anteriores.
- O CR induziu redução da expressão de γ -actina na linhagem tumoral triplo-negativa MDA-MB-231. Apesar da redução da expressão gênica não ter sido significativa entre os tratamentos, acredita-se que há uma tendência de efeito dose-dependente e que a indução negativa do CR à expressão γ -actina tem relevância biológica no processo de citotoxicidade ocasionado por este composto.

Os resultados do atual estudo foram de fundamental importância para se estabelecer uma correlação entre o efeito citotóxico do CR e sua atuação sobre os filamentos de actina. Os efeitos associados a uma modulação negativa da γ -actina nos ensaios iniciais de RT-qPCR corroboram com a hipótese inicial de que as alterações expressivas na morfologia da actina, notada em estudos prévios (Carneiro et al, 2011), deve estar associada com a redução na sua expressão gênica nas linhagens investigadas.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesta pesquisa nos conduzirão a estabelecer novas abordagens e perspectivas de investigação relacionadas à dinâmica de regulação da despolimerização da actina mediada por outras proteínas citosólicas, visto que as células que receberam tratamento apresentaram uma morfologia alterada, evidenciando a interferência que o CR tem no citoesqueleto das células.

Uma vez que coexiste no citoesqueleto dos eucariontes, estudos sobre a análise da expressão gênica de β -actina e também da síntese de γ -actina e β -actina induzidos por CR deverão também ser considerados. Além disso, é importante avaliar a atividade da expressão de microRNAs envolvidos no processo de despolimerização da actina, bem como desenvolver ferramentas biotecnológicas como o uso de miméticos e antagonistas da expressão destas moléculas e, com isso, aumentar a eficácia da quimioterapia com CR. Todos os pontos aqui levantados são parte da continuidade deste trabalho e já estão sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

9. REFERÊNCIAS

AMENDOLA, L.C.B. & VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 51(4): 325-330. **2005**

American Cancer Society (ACS). Disponível em: <<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/index>>. Acesso em: 26 jul. **2017**.

ASLAM, M.S., *et al.* Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy*, 5, 817-822. **2014**.

AZZAWI, M., *et al.* Nanotechnology for the diagnosis and treatment of diseases, Future Medicine. *Nanomedicine*, 11 (16). 2025-2027. **2016**.

CARNEIRO, M.L.B. *et al.* Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*. **2011**. 9: 11-27.

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**.

CHAVES, N.L. Estudo da interação entre nanopartículas de maghemita associadas ao citrato de ródio e células de câncer de mama. Tese de doutorado em Biologia Animal. Universidade de Brasília. Brasília. **2017**.

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**.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. De Robertis – Bases da Biologia Celular e Molecular. 4ª Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **2006**.

DUFFY, M.J., *et al.* Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *European Journal of Cancer*, Volume 75, 284 – 298. **2017**.

FLORES, M.L. *et al.* Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. *Breast Cancer Res Treat.* Jun;133(3):917-28. **2012**

GOURLAY, C.W, AYSCOUGH KR. The actin cytoskeleton in ageing and apoptosis. *FEMS Yeast Research*, 5: 1193–1198, **2005**.

GRIVICICH, I, REGNER A, ROCHA AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3): 335-343, **2007**.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Mama**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 26 jul. **2017**.

JORDAN, M.A., WILSON L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol*. 10(1):123-30. **1998**.

KATSAROS, N., ANAGNOSTOPOULOU, A. Rhodium and its compounds as potencial agents in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 54: 297-308, **2002**.

LODISH, H. *et al*. Molecular Cell Biology. Capítulo 18. Cell Motility and Shape I: Microfilaments. 4ª ed., Freeman, New York. **2000**.

MELO, S.A., ESTELLER, M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS Letters*, 585: 2087-2099, **2011**.

NUNES, E.S. Citrato de ródio (II): síntese, caracterização, adsorção em nanopartículas de maghemita e preparação de fluidos magnéticos. *Dissertação de mestrado em Química. Universidade Federal do Goiás*. Goiânia. **2010**.

RAFIQUE, S.M., et al. Transition metal complexes as potential therapeutic agents. *Biotech. Mol. Biol. Rev* 5, 38-45. **2010**.

RANG, H.P., *et al*. Farmacologia. Capítulo 5. Proliferação, Apoptose, Reparo e Regeneração Celular 7ª ed., Elsevier, Rio de Janeiro. **2011**.

RAO, K.M. & COHEN, H.J. Actin cytoskeletal network in aging and cancer. *Mutation Research*;256(2-6):139-48. 1991.

RONINSON, I. B.; BROUDE, E. V., CHANG, B. D. If not apoptosis, then what? Treatment induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat*, v. 4, n. 5, p. 303-313. 2001.

SHARMA, G.N., *et al*. Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(2), 109–126. **2010**.

SHAVERDASHVILI, K., *et al*. MT1-MMP dependent repression of the tumor suppressor SPRY4 contributes to MT1-MMP driven melanoma cell motility. *Oncotarget*, 6(32), 33512–33522. **2015**.

SUN, Q. *et al*. Expression Profiling Reveals Dysregulation of Cellular Cytoskeletal Genes in HBx-Induced Hepatocarcinogenesis. *Cancer Biology & Therapy*. 6:5, 668-674, **2007**.

VALASTYAN, S. Roles of microRNAs and other non-coding RNAs in breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 17, 2332, **2012**.

WEINBERG, R.A. The biology of cancer. Capítulo 2. The nature of cancer. Garland Science, 2ª ed. 2013

XU, X., FORBES, J.G., COLOMBINI, M. Actin Modulates the Gating of Neurospora crassa VDAC. *J Membrane Biol*, 180(1): 73-81, **2001**.

YAMAGUCHI, H. & CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773, 642–652. **2007**

ZHANG, Z.J., Ma, S.L.miRNAs in breast cancer tumorigenesis (Review). *Oncol Rep*, 27, 903-910, **2012**.