



Universidade de Brasília

**FACULDADE UnB PLANALTINA
CIÊNCIAS NATURAIS**

**EFEITOS BIOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO DE MIR-34A
E CITRATO DE RÓDIO LIVRE E ASSOCIADO À
NANOPARTÍCULAS EM CULTURA DE CÉLULAS DE
CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

Thamis Fernandes Santana

ORIENTADOR (A): Marcella Lemos Brettas Carneiro

**Planaltina-DF
Junho 2018**



Universidade de Brasília

FACULDADE UnB PLANALTINA

CIÊNCIAS NATURAIS

**EFEITOS BIOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO DE MIR-34A
E CITRATO DE RÓDIO LIVRE E ASSOCIADO À
NANOPARTÍCULAS EM CULTURA DE CÉLULAS DE
CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

Thamis Fernandes Santana

ORIENTADOR (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 Ciências Naturais, da Faculdade UnB Planaltina, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Marcella Lemos Brettas Carneiro.

**Planaltina-DF
Junho 2018**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por toda proteção que me concede a cada dia e me concedeu a cada ida à Universidade e volta para casa, dando-me coragem para perseverar na caminhada da graduação!

À minha orientadora, a professora Dra. Marcella Lemos, por todos os ensinamentos e motivação! Por enxergar em mim a possibilidade de crescer e fazer despertar em mim o amor pela ciência. E ainda, por ter me ensinado a ser uma pessoa melhor e buscar sempre o lado bom de todas as coisas!

À minha família, em especial aos meus pais, que me motivaram e se esforçaram para que eu pudesse iniciar e concluir a graduação e pelas suas preocupações diariamente quando contavam os minutos em cada retorno até minha casa!

Ao meu namorado Jean, por todo amor, cuidado, companheirismo, compreensão e paciência! Por estar sempre ao meu lado compartilhando comigo os melhores momentos e me dando forças e me consolando nos momentos difíceis!

Aos amigos da faculdade, em especial à Josiara, minha mãe de coração, por tornar o dia mais alegre com sua presença e por sempre me dar o apoio necessário e orientação nos momentos de angústia; e à Olga, companheira dos momentos de distração e descanso quando a mente já se apresentava cansada; e a todos que partilharam comigo a jornada da graduação!

A todos os professores da Faculdade UnB Planaltina, por sua tão grande e importante contribuição na aquisição de conhecimento e experiência!

Aos colegas do Laboratório de Microscopia, onde realizei grande parte deste trabalho através da ajuda, paciência e disponibilidade das pessoas incríveis que lá conheci!

Aos colaboradores do Laboratório de Terapia Gênica que muito me ajudaram com os experimentos de RT-qPCR.

RESUMO

O citrato de ródio (RhCit) é um complexo metálico que apresentou atividade citotóxica e antitumoral em linhagens de câncer de mama sem induzir toxicidade sistêmica *in vivo*. No ramo da nanotecnologia, a maghemita, mostrou efeito antitumoral em estudos *in vivo* e esse foi aumentado através de sua associação com citrato de ródio (RhCit-MGH) em células de câncer de mama. Na interferência de RNA (RNAi), os microRNAs têm sido bastante estudados no câncer, em especial o miR-34a, um supressor tumoral que se encontra silenciado em diversos cânceres e mostrou elevado potencial para inibir a invasão, migração e metástase do câncer de mama. Neste estudo, avaliamos os efeitos de RhCit e RhCit-MGH sobre a morfologia de células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e saudáveis (MFC-10A) por microscopia óptica, efeito de RhCit sobre a modulação do nível de miR-34a por RT-qPCR e efeito citotóxico da associação de miR-34a com RhCit-MGH por fluorimetria. Observou-se que os tratamentos com RhCit e RhCit-MGH induziram alterações morfológicas nas doses de 50 e 250 μM , especialmente em células de carcinoma mamário humano. Adicionalmente, foi demonstrado que a expressão de miR-34a manteve-se inalterada após tratamento com RhCit nas linhagens tumorais e que RhCit-MGH e a associação de miR-34a a RhCit-MGH induziram citotoxicidade à linhagem tumoral MDA-MB-231 e à linhagem saudável MCF-10A, enquanto que a linhagem tumoral MCF-7 apresentou resistência aos tratamentos. Este trabalho trata-se de uma proposta inovadora (nanotecnologia e RNAi) que apresenta relevante potencial biotecnológico na terapêutica do câncer de mama, necessitando de mais estudos para melhor compreender os efeitos de RhCit e RhCit-MGH sobre o miR-34a.

Palavras-chave: Câncer de mama, Citrato de Ródio, Nanotecnologia, Interferência de RNA, MiR-34a.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo geral:.....	8
2.2. Objetivos específicos:	8
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
3.1. Câncer de Mama.....	9
3.2. Estratégias terapêuticas para o câncer de mama e suas limitações	11
3.3. Citrato de ródio.....	11
3.4. Nanopartículas de maghemita	11
3.5. Interferência de RNA	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. Cultura e manutenção das células	15
4.2. Tratamento das Células	17
4.3. Ensaio de morfologia celular.....	17
4.4. Extração e quantificação de microRNA total.....	18
4.5. Transcrição reversa (RT) para síntese do DNA complementar (cDNA).....	18
4.6. Amplificação e quantificação de miR-34a por qPCR	18
4.7. Transfecção com oligonucleotídeos sintéticos mimetizadores de miR-34a.....	19
4.8. Ensaio de viabilidade celular.....	19
4.9. Análise estatística.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
5.1. Análise da morfologia celular	20
5.2. Análise da Expressão de miR-34a.....	21
5.3. Ensaio de Viabilidade Celular.....	22
6. CONCLUSÕES.....	25

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que tem como característica principal o crescimento desordenado de células que sofreram uma alteração no seu DNA. A doença é um dos problemas mais complexos que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, visto que pelo menos um terço dos novos casos que ocorrem no mundo anualmente poderia ser evitado (INCA, 2017). Numa estimativa realizada em 2012, o câncer de mama foi o segundo mais incidente no mundo, representando 25,2% dos casos (1,7 milhão) e apresentou taxa de mortalidade um terço menor que a taxa de incidência (522 mil óbitos). Para o biênio 2018-2019 estima-se que haverá quase 60 mil novos casos de câncer de mama por ano no Brasil (INCA, 2017).

Atualmente, as principais estratégias terapêuticas para esta enfermidade são cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia direcionada e imunoterapia. Porém, todas causam efeitos adversos nos pacientes em decorrência da toxicidade sistêmica (BERGMANN *et al.*, 2000). Levando em consideração a incidência do câncer de mama e os efeitos que os tratamentos provocam, faz-se necessário realizar ações de prevenção e controle da doença por meio do desenvolvimento de tecnologias nesta área.

Dentre alguns compostos metálicos com potencial para uso na quimioterapia, os carboxilatos de ródio apresentaram significativa atividade citotóxica nos tumores L1210, carcinoma de ascite de Ehrlich, sarcoma 180 e P388 e melanoma B16 (KATSAROS E ANAGNOSTOPOULOU, 2002). Nosso grupo tem demonstrado os efeitos citotóxico e antitumoral de citrato de ródio livre (RhCit) e associado a nanopartículas de maghemita (RhCit-MGH) em células de carcinoma mamário *in vitro* e *in vivo* (CARNEIRO *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2015). Sobretudo, foi notado que o composto associado à nanopartículas, RhCit-MGH, 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. Em relação aos estudos *in vitro* foi demonstrado que o citrato de ródio induz células das linhagens MCF-7 e 4T1 à apoptose, já que provocaram alterações morfológicas como fragmentação nuclear, bolhas de membrana e exposição à fosfatidilserina, condensação mitocondrial, aumento do número de vacúolos e redução dos filamentos de actina (CARNEIRO *et al.* 2011).

Há evidências de que a despolimerização da actina é mediada por uma variedade de proteínas que regulam sinais para apoptose e metástase, o que a torna um importante alvo terapêutico. A dinâmica de polimerização e despolimerização da actina pode envolver mecanismos regulatórios de expressão gênica bem como da transcrição de microRNAs (miRNAs), que são RNAs curtos, não-codantes e que regulam a expressão de genes alvos a nível pós-transcricional. Como células de câncer mamário apresentam padrões aberrantes na expressão de miRNAs, o conhecimento sobre a biologia tumoral e a regulação de miRNAs também têm revelado claro potencial terapêutico no campo da interferência de RNA (RNAi) (MELO E ESTELLER, 2010; ZHANG E MA, 2011). Geralmente, a disfunção da expressão de miRNAs está associada a regulação de genes-alvo relacionados tanto na transformação oncogênica como na supressão tumoral. Portanto, o emprego de oligonucleotídeos sintéticos exógenos que mimetizem miRNAs supressores de tumor ou inibidores de oncogenes pode ser utilizado estrategicamente visando tratamento de câncer (IORIO *et al.*, 2011; KRELL *et al.*, 2012).

Neste contexto, estratégias experimentais permitem modificar o conteúdo de determinado miRNA de acordo com o estudo em questão. Assim, o processo de RNAi pode ser

realizado mediante o uso de moléculas curtas de RNA sintético que irão atuar de maneira semelhante aos miRNAs de ocorrência natural, uma vez que miRNAs se ligam aos mRNAs alvos, suprimindo ou estimulando a tradução de proteínas na célula (DAVIDSON E MCCRAY, 2011). Dentre vários miRNAs de interesse na oncologia, o miR-34a (da família de miRNAs supressores de tumor) é considerado um mediador crítico de p53 (gene supressor de tumor), uma vez que está relacionado com a síntese da proteína em questão e subsequente indução de apoptose (CHO, 2011; MISSO *et al.*, 2014).

Visto que o câncer de mama possui alta incidência e tratamentos pouco específicos, este trabalho buscou alternativas mais direcionadas, trazendo uma proposta inovadora (associação de quimioterapia e terapia gênica) que apresenta relevante potencial biotecnológico na terapêutica para este tipo de câncer.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Avaliar se os tratamentos com RhCit e RhCit-MGH, em associação com *mimic* de miR-34a, induzem alterações na expressão gênica de mir-34a e na viabilidade de células de carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231) e epiteliais da mama normais (MCF-10A).

2.2. Objetivos específicos:

- Analisar se RhCit e RhCit-MGH alteram a morfologia celular das linhagens celulares de carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231) e normais (MCF-10A) por meio de microscopia óptica;
- Analisar se RhCit afeta a expressão de miR-34a em células de carcinoma mamário MCF-7 e MDA-MB-231 por meio de RT-qPCR;
- Avaliar se a associação de *mimics* de miR-34a com RhCit-MGH altera a viabilidade celular por meio de ensaio de espectrofotometria utilizando alamarBlue™.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Câncer de Mama

O câncer de mama é uma doença de alta incidência (figura 1), sendo o mais comum que acomete mulheres no Brasil e no mundo (exceto câncer de pele não-melanoma) representando 29,5% do total de novos casos por ano no Brasil. Para o ano de 2018 o INCA estima 59.700 novos casos deste tipo de câncer (INCA, 2017).



	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma. INCA, 2017.

Mulheres acima dos 50 anos são mais propensas a desenvolver a doença, sendo o envelhecimento o seu principal fator de risco. Ainda há fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher como menarca precoce, menopausa tardia, primeira gravidez acima dos 30 anos, predisposição genética, não ter tido filhos, uso de anticoncepcionais orais e de terapia de reposição hormonal (INCA, 2017; BELLINI *et al.*, 2017; ZAIDI *et al.*, 2018). Ainda, a ingestão de bebida alcóolica, sobrepeso, exposição à radiação e obesidade após a menopausa representam outros importantes fatores de risco na patogenia do câncer de mama (INCA, 2017).

Há diversos tipos de câncer de mama classificados de acordo com o crescimento celular, sendo que os tipos mais comuns são carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo e carcinoma lobular invasivo. A maioria dos cânceres de mama é carcinoma, tumores que começam nas células epiteliais, as quais revestem órgãos e tecidos. Existe ainda o adenocarcinoma, um carcinoma que começa em células que compõem o tecido glandular. No caso do adenocarcinoma mamário, o tumor tem início nas glândulas produtoras de leite. Os carcinomas são ainda descritos conforme sua extensão. Cancros localizados são chamados de *in situ* e os que se espalham para tecidos circundantes da mama são chamados invasivos e, portanto, potencialmente metastático (figura 2) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

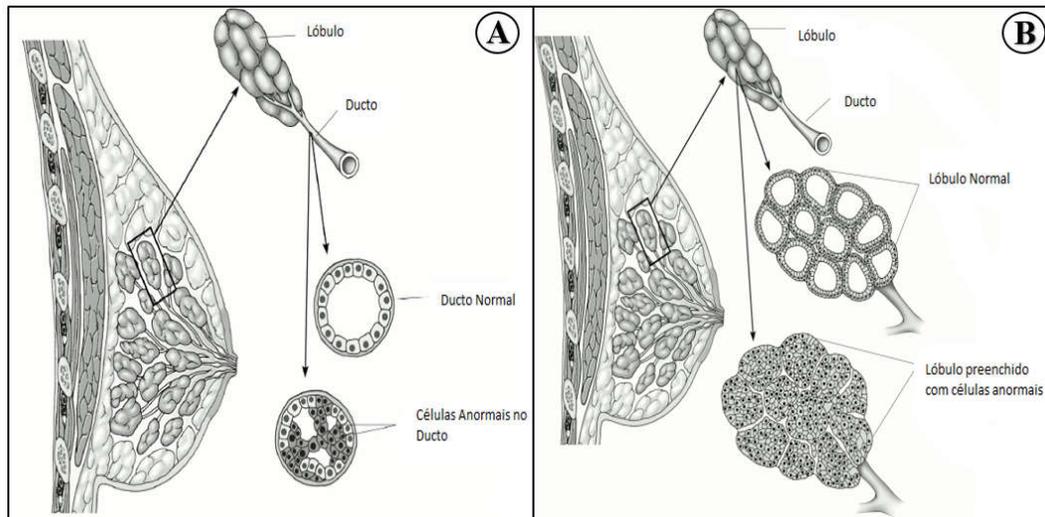


Figura 2: Tipos mais frequentes de adenocarcinoma mamário humano. (A) Carcinoma ductal *in situ* (CDIS). (B) Carcinoma lobular *in situ* (CLIS). Adaptado de American Cancer Society, 2018.

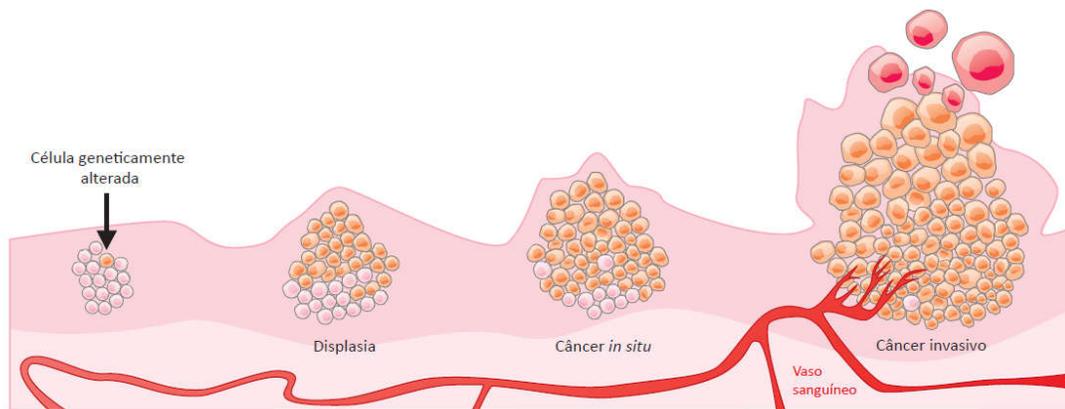


Figura 3: Tipos de crescimento celular. Fonte: ABC do Câncer, 2017.

Para tratamento, prevenção e expectativa de recidiva deste tipo de câncer é feita uma classificação molecular, de acordo com a presença de receptores de hormônios presentes em suas células. Assim, o câncer de mama é classificado como ER-positivo para câncer que possui receptor de estrogênio (ER); EP-positivo para o que possui receptor de progesterona (PR) e HER2-positivo quando expressa o receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). O câncer que não possui nenhum desses receptores é denominado câncer de mama triplo-negativo. A expressão e as atividades biológicas desses receptores ligados à membrana desempenham papel importante na iniciação e progressão do câncer de mama (ABDEL-FATAH *et al.*, 2017; ZAIDI *et al.*, 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

3.2. Estratégias terapêuticas para o câncer de mama e suas limitações

O tratamento para o câncer de mama é definido de acordo com o seu tipo e estágio em que se encontra. Quanto mais cedo for diagnosticado, melhor será o resultado do tratamento. Atualmente, existem diversas terapias para essa doença podendo ser cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia ou a combinação entre elas. Porém, essas terapias possuem limitações em seu uso e eficácia relativa. Cirurgia e radioterapia são tratamentos locais e geralmente utilizados para tratar o câncer em estágios iniciais, enquanto a quimioterapia é um tratamento sistêmico em que se utiliza drogas ou hormônios (hormonioterapia) para conter o crescimento das células tumorais em casos mais avançados (ISRAEL *et al.*, 2018).

Dentre as limitações terapêuticas encontradas nestas modalidades destaca-se (1) possibilidade de reaparecimento do tumor (BELKACEMI *et al.*, 2018) nos casos cirúrgicos; (2) efeitos adversos como dano físico, inchaço de membros, vômitos e redução da imunidade (XUE *et al.*, 2018) no caso da radioterapia e (3) infecção, febre, anemia, náusea, diarreia, desidratação, entre outros no caso de quimioterapia (HASSETT *et al.*, 2006).

3.3. Citrato de ródio

Carboxilatos de ródio possuem capacidade de desemparelhar bases nitrogenadas de DNA, inibindo sua síntese (JUNICKE *et al.*, 2003). Esta classe de complexos metálicos apresenta atividade antitumoral em leucemia linfocítica P388, carcinoma oral, melanoma L1210 e B16, carcinoma mamário MCa e carcinoma pulmonar de Lewis (KATSAROS E ANAGNOSTOPOULOU, 2002) e, ainda, citotóxica e citostática em tumor ascítico de Ehrlich, MCF-7 e 4T1 (ZYNGIER *et al.*, 1989, CARNEIRO *et al.*, 2011).

O citrato de ródio (RhCit) é um complexo metálico da família dos carboxilatos de ródio e mostrou-se citotóxico às linhagens celulares de carcinoma mamário (MCF-7 e 4T1) e à linhagem celular normal da mama (MCF-10A) em estudos *in vitro* (CARNEIRO *et al.*, 2011). No estudo conduzido por Carneiro e colaboradores (2011) foi demonstrado que este complexo induz alterações morfológicas em linhagens celulares tumorais de mama (MCF-7 e 4T1) que podem estar associadas a eventos apoptóticos. Além disso, foi observado, em estudos *in vivo*, que RhCit apresentou efeito antitumoral sem induzir significativa toxicidade sistêmica (CARNEIRO *et al.*, 2013).

3.4. Nanopartículas de maghemita

A nanotecnologia, um campo que abrange a criação e estudo de materiais em escala nanométrica, tem sido bastante utilizada em áreas como medicina, biotecnologia e setor agrícola (LIU *et al.*, 2018) e ainda mostra potencial para entrega controlada de drogas (KALIMUTHU *et al.*, 2018) e detecção e entrega de miRNA (CHAUDHARY; JANGRA; YADAV, 2018).

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro podem ser aplicadas no campo biomédico para diagnóstico, entrega de droga, purificação celular, entre outros. A combinação dessas diversas propriedades juntamente com um campo magnético pode proporcionar melhor entrega de medicamentos visto que, em ensaios *in vitro*, as células mostraram melhor absorção dessas nanopartículas sob influência de um campo magnético (JUNEJA E ROY, 2018).

A maghemita, uma nanopartícula magnética de óxido de ferro, mostrou efeito

antitumoral em estudos *in vivo* e teve seu efeito aumentado através de sua associação do citrato de ródio (CARNEIRO *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2017) e esse composto foi melhor captado por células de câncer de mama do que em células normais (CHAVES *et al.*, 2017).

3.5. Interferência de RNA

A interferência de RNA (RNAi), processo pelo qual RNAs curtos inibem, especificamente, a expressão de determinados genes a nível pós-transcricional sofreu grandes avanços dez anos após Fire e Melo ganharem o Prêmio Nobel pela descoberta de silenciamento gênico através de RNAs de dupla fita (GONDI E RAO, 2009; TIEMANN E ROSSI, 2009; TITZE-DE-ALMEIDA E DAVID E TITZE-DE-ALMEIDA, 2017). RNAi possui duas vias biológicas: siRNA e miRNA (figura 4).

Na via siRNA (*short* ou *small-interfering*), moléculas de RNA de cadeia dupla (dsRNA) de patógenos ou genes celulares infectantes são processadas por uma enzima ribonuclease Dicer, que interage com TRBP e PACT, formando dsRNA curto com 22 nucleotídeos. SiRNAs sintéticos também podem ser introduzidos nas células. Independentemente da sua origem, os siRNAs são incorporados em um complexo de proteínas: complexo silenciador induzido por RNA (RISC). A endonuclease Argonaute 2 (AGO) remove o filamento de sentido ("*sense*") do siRNA, permitindo que a cadeia *antisense* ou guia se ligue a sequências totalmente complementares na região de codificação de mRNA (CDS) provocando o silenciamento gênico através da clivagem do RNA mensageiro (mRNA). Em resumo, os siRNAs conduzem o RISC ativo ao RNA específico para clivagem pela enzima AGO (TITZE-DE-ALMEIDA E DAVID E TITZE-DE-ALMEIDA, 2017).

A via de miRNA (microRNA) realiza o silenciamento gênico através da queda da tradução e/ou estabilidade do mRNA por meio de pareamento parcialmente complementar ao mRNA. MicroRNAs são codificados por genes presentes no DNA de mamíferos. No núcleo, a RNA polimerase II (Pol II) transcreve genes de miRNA em sequências longas de RNA de centenas de nucleotídeos. Transcrições geram uma forma peculiar de um *hairpin* (gancho de cabelo). Cada *hairpin* é um duplex de 70 ribonucleotídeos parcialmente complementares que termina com uma curta sequência não complementar (*loop*). O miRNA é processado ainda no núcleo da célula onde é revestido de 7-metil-guanosina (m7G) na extremidade 5' e poliadenilado na extremidade 3', formando o miRNA primário (Pri-miRNA). As enzimas Drosha e DGCR8 clivam sequências de RNA fora do *hairpin* para formar o precursor do miRNA (Pre-miRNA), exportado para o citoplasma por *Exportin 5*. A enzima Dicer processa o Pre-miRNA em um miRNA com 18- 25 nucleotídeos. O duplex de miRNA associa-se ao RISC (miRISC), a cadeia de sentido é removida e a fita guia liga sequências complementares nos mRNAs alvos. A diferença com o siRNA é que miRNAs se ligam a vários mRNAs com pareamento parcialmente complementar, e as sequências-alvo são colocadas na região 3'-UTR. A ausência de uma complementaridade completa entre as seqüências de miRNA e mRNA compromete a atividade da endonuclease AGO. Em consequência, o efeito é uma repressão translacional ou degradação de mRNA em vez de clivagem de mRNA por AGO. Os miRNAs sintéticos (miRNA *mimic*) ou sequências *antisense* que inibem miRNAs específicos (*AntimiR*) servem para modular artificialmente o conteúdo de miRNA (TITZE-DE-ALMEIDA E DAVID E TITZE-DE-ALMEIDA, 2017).

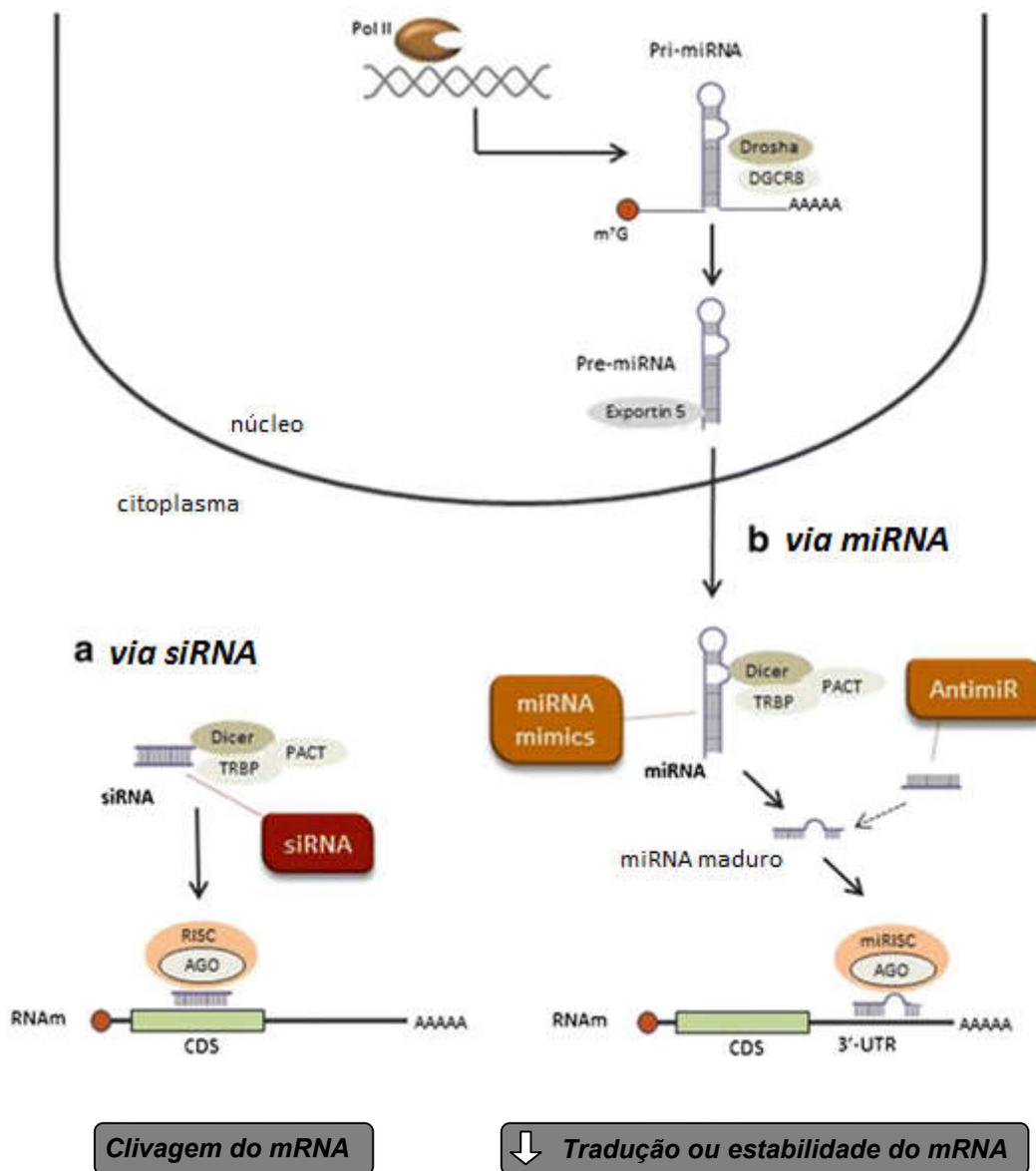


Figura 4: As vias de RNAi. **(a)** via de siRNA. Moléculas de RNA de cadeia dupla são processadas por Dicer, que interage com TRBP e PACT, formando dsRNA curto. SiRNAs sintéticos podem ser introduzidos nas células (caixa vermelha). SiRNAs serão incorporados ao complexo RISC. A endonuclease Argonate 2 (AGO) remove o filamento de sentido ("sense") do siRNA, permitindo que a cadeia *antisense* ou guia se ligue completamente na região codante do mRNA (CDS). Em resumo, os siRNAs conduzem o RISC ativo ao mRNA específico para clivagem pela enzima AGO. **(b)** via miRNA. MicroRNAs (miRNA) são codificados por genes presentes no DNA de mamíferos. A RNA polimerase II (Pol II, em marrom) transcreverá genes de miRNA, gerando uma forma peculiar de um *hairpin*. O miRNA é processado no núcleo da célula, formando o miRNA primário (Pri-miRNA). As enzimas Droscha e DGCR8 clivam as sequências fora do *hairpin* formando Pre-miRNA, que é exportado para o citoplasma por *Exportin 5*. A enzima Dicer processa o Pre-miRNA em um miRNA. O duplex de miRNA associa-se ao RISC (miRISC), a cadeia de sentido é removida e a fita guia liga parcialmente a sequências complementares nos mRNAs alvo causando uma repressão translacional ou degradação de mRNA. Os miRNAs sintéticos (miRNA *mimic*) ou sequências *antisense* que inibem miRNAs específicos (*AntimiR*) modulam artificialmente o conteúdo de miRNA (caixas de laranja). Fonte: Adaptado de TITZE-DE-ALMEIDA, DAVID E TITZE-DE-ALMEIDA (2017).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura e manutenção das células

As duas linhagens celulares tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) e a linhagem de células saudáveis epiteliais de mama (MCF-10A) foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). 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 1 mM de piruvato (somente em RPMI), obtidos pela empresa GIBCO™. As células da linhagem MCF-10A foram cultivadas em meio Dulbecos' smodifiedEagle' smedium/NutrientMixtureHam' 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®).

O crescimento das células foi acompanhado visualizando-as em microscópio óptico invertido (AxioVert. A1, Zeiss). As passagens (repiques) foram feitas quando as células atingiam confluência de aproximadamente 70% no frasco de cultura. As células eram então semeadas em densidade inicial de cerca de 30% da confluência, repicadas duas vezes por semana e mantidas em incubadora úmida até atingirem um número suficiente para os experimentos. Os frascos com cultivo celular eram lavados com *Phosphate-Buffered Saline* (PBS 1x, GIBCO™) e os repiques realizados por meio da ação proteolítica de solução 0,25% de tripsina-EDTA (GIBCO™) com incubação entre 3 e 7 minutos a 37°C. A seguir, a ação proteolítica era neutralizada pela ressuspensão das células em meio de cultura com soro. O número de células para os experimentos era estimado por meio de contagem direta em câmara de Neubauer e utilizava-se o método de exclusão por azul de Tripán (GIBCO™) para distinção de células viáveis.

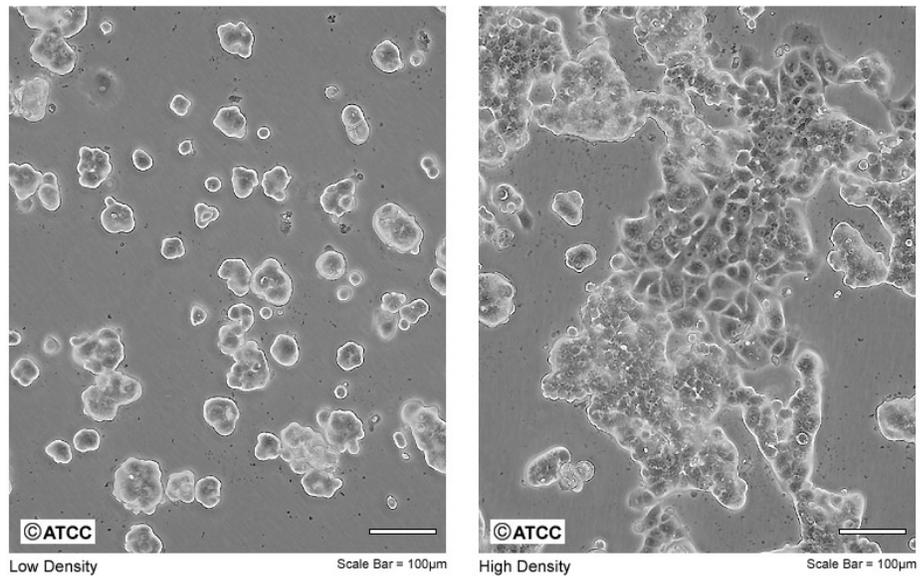


Figura 6: Linhagem tumoral MCF-7. Fonte: ATCC.

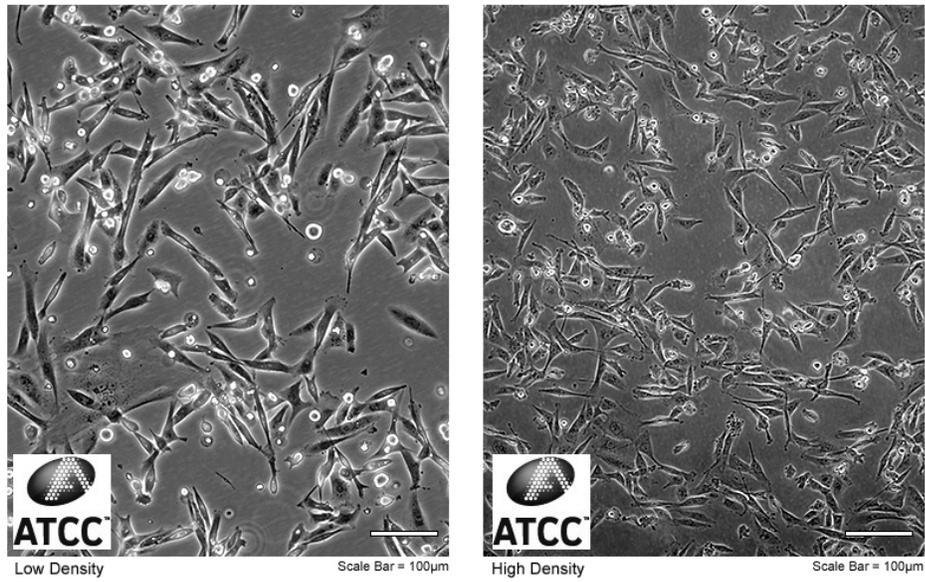


Figura 7: Linhagem tumoral MDA-MB-231. Fonte: ATCC.

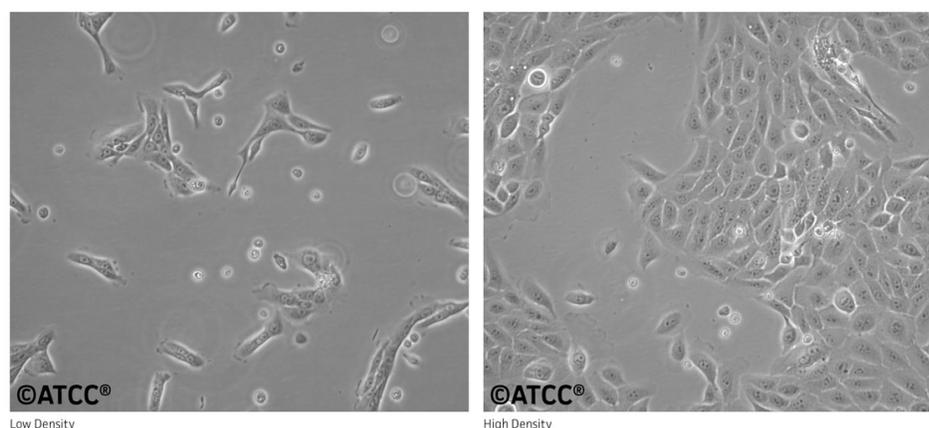


Figura 8: Linhagem não tumoral MCF-10A. Fonte: ATCC

4.2. Tratamento das Células

O complexo de citrato de ródio livre (RhCit) e associado à nanopartículas de maghemita (RhCit-MGH) foram sintetizados e cedidos pelo Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Para os ensaios de morfologia celular, as células foram semeadas em placas de 24 poços ($1,4 \times 10^4 / \text{cm}^2$) e tratadas com RhCit ou RhCit-MGH nas doses de 50 ou 250 μM , ou mantidas apenas em meio de cultura por 48 horas. Para ensaios de RT-qPCR as células foram semeadas em placas de 6 poços com densidade inicial de 5×10^5 e 24 horas depois tratadas com RhCit na dose de 250 μM . Após os tratamentos, as células foram mantidas em incubadora úmida por 48 horas.

Para ensaios de viabilidade celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 células por poço e, 24 horas depois, realizou-se a transfecção de *mimics* de miR-34a. Após 24 horas, as células foram tratadas com RhCit-MGH na dose de 250 μM e incubadas por 48 horas.

4.3. Ensaio de morfologia celular

Após os tratamentos com RhCit e RhCit-MGH (50 e 250 μM) por 48 horas as células foram coradas, na própria placa de cultura, utilizando o kit de Corante Rápido para Hematologia InstantProv (Newprov). Foram colocados em cada poço os reagentes I, II e III do kit, nesta sequência, e deixados por 15, 15 e 20 segundos, respectivamente. Após cada um desses períodos, verteu-se a placa por cinco segundos para descartar os reagentes e, ao final de todo o processo, os poços foram lavados com água destilada. A coloração ocorreu através da afinidade eletiva das células por corantes ácidos ou básicos, permitindo a distinção entre núcleo e citoplasma.

Em seguida, foram obtidas as imagens por meio de microscópio de luz invertido (Axiovert 100, Zeiss, Alemanha) com o auxílio de uma câmera acoplada e do programa de captura de imagens AxioVisionLE.

4.4.Extração e quantificação de microRNA total

Para obtenção do *pellet*, após tratamento com RhCit, retirou-se os meios dos poços e as células foram desaderidas utilizando-se tripsina-EDTA (GIBCO™) com incubação entre 3 e 7 minutos a 37°C. A seguir, a ação proteolítica foi neutralizada pela ressuspensão das células em meio de cultura com soro. Os conteúdos dos poços foram colocados em tubos de 2 ml e centrifugados por 4 minutos as 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em *Phosphate-Buffered Saline* (PBS 1x, GIBCO™). Repetiu-se a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi congelado a -80°C até o momento da extração.

A extração de miRNA das células foi realizada utilizando o kit comercial mirVana™ *miRNA Isolation Kit* (Ambion® bylifetechnologies™, EUA), com base nas instruções do fabricante, e posteriormente estocadas a -20°C até o momento de uso. O miRNA foi quantificado por fluorimetria utilizando-se o equipamento Qubit® 2.0 *Fluorometer* (Invitrogen, Califórnia, EUA) e kit de quantificação para RNA e miRNA total (Qubit® RNA BR Assay Kit) (Molecular Probes® bylifetechnologies™, EUA).

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

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 2 ng de miRNA total. Utilizou-se o kit comercial TaqMan™ *MicroRNA Reverse Transcription Kit* (AppliedBiosystems™), seguindo as instruções do fabricante, e *primers* específicos para o alvo (miR-34a) e para o controle endógeno (RNU6B). A reação foi realizada em termociclador MyCycler™ (Bio-Rad, USA). Após a transcrição reversa, as amostras de cDNA foram mantidas na temperatura de -20°C até o momento do ensaio de qPCR.

4.6.Amplificação e quantificação de miR-34a por qPCR

Na reação de qPCR em tempo real (*real time quantitative Polymerase Chain Reaction*) também foram utilizados *primers* específicos para a sequência de miR-34a e *primers* para o controle endógeno (RNU6B). A reação foi realizada em termociclador QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, Califórnia, USA). Utilizou-se TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™ byThermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante.

De maneira geral, o sistema detecta os produtos de amplificação por meio de sondas marcadas com fluoróforos que usam a atividade da *Taq DNA polymerase* durante o processo. As condições experimentais da qPCR foram de 50°C por 2 minutos e 95°C por 20 segundos (desnaturação inicial) seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos (desnaturação) e 60°C por 30 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 9), que é uma análise comparativa do material genético do alvo com um controle interno normalizado com um gene de referência/controle endógeno (*house keeping gene*), foi utilizado para demonstrar o conteúdo de miR-34a.

$$\Delta Ct = Ct (\text{alvo}) - Ct (\text{refer\^encia})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra}) - \Delta Ct (\text{controle})$$

$$\text{Express\~ao Relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Figura 9: F\~ormula logar\^itmica de quantifica\~ao relativa pelo m\^etodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O Ct refere-se ao n\~umero de ciclos em que a rea\~cao cruza o limiar de detec\~cao, sendo o n\~ivel de fluoresc\^encia onde a rea\~cao \^e detectada durante a fase exponencial como uma linha de compara\~ao entre as amostras. O resultado dessa f\~ormula demonstra quantas vezes o gene de interesse foi mais ou menos expressado no tratamento do que no controle.

4.7. Transfec\~ao com oligonucleot\^deos sint\^eticos mimetizadores de miR-34a

A transfec\~ao dos *mimics* de miR-34a foi realizada 24 horas ap\~os o plaqueamento das c\^elulas. O mix de transfec\~ao foi feito utilizando o reagente de transfec\~ao INTERFERin® (Polyplus transfection®), conforme recomenda\~oes do fabricante, contendo *mimics* de miR-34a na concentra\~ao de 30 nM. Ap\~os adicionar o mix de transfec\~ao, as c\^elulas foram incubadas por 24 horas a 37°C e, ap\~os este per\^odo, procedeu-se aos tratamentos com RhCit e RhCit-MGH.

4.8. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o reagente alamarBlue™ (Invitrogen™), uma solu\~ao baseada em resazurina que funciona como um indicador de sa\~ude celular usando o poder redutor de c\^elulas vivas para medir quantitativamente a viabilidade. A resazurina, o ingrediente ativo do reagente alamarBlue™, \^e um composto perme\~avel \^as c\^elulas, n\~ao t\~oxico, de cor azul e praticamente n\~ao fluorescente. Ao entrar nas c\^elulas vivas, a resazurina \^e reduzida a resorufina, um composto que \^e vermelho e altamente fluorescente.

Decorridas 48 horas dos tratamentos, retirou-se os conte\~udos dos po\~os, colocou-se 150 μ L de meio de cultura mais 15 μ L de alamarBlue™. Ent\~ao as placas foram incubadas a 37°C por 3 horas e realizada a leitura por fluoresc\^encia no leitor de placas EnSpireMultimode (PerkingElmer) com excita\~ao a 570 nm e emiss\~ao a 585 nm.

4.9. An\~alise estat\^istica

Os dados foram expressos como m\^edia \pm erro padr\~ao da m\^edia e submetidos \^a an\~alise de vari\~ancia *one-way* (ANOVA) ou *Student's T-test* seguido do p\~os-teste de Tukey. Foi considerada diferen\~ca estat\^istica quando $p < 0,05$. As an\~alises estat\^isticas foram realizadas por meio do programa *GraphPad Prism* (vers\~ao 7.0).

A express\~ao relativa de Ct (*threshold cycle*) foi calculada pelo m\^etodo logaritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (express\~ao relativa normalizada pelo controle end\~ogeno RNU6B (ΔCt) e pela express\~ao do grupo n\~ao tratado (NT) ($\Delta\Delta Ct$), considerado como 1,0 (100% de express\~ao).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Análise da morfologia celular

Células tumorais (MDA-MB-231 e MCF-7) e saudáveis (MCF-10A) apresentaram alterações morfológicas após 48 h de tratamento com citrato de ródio livre (RhCit) e associado à nanopartículas de maghemita (RhCit-MGH) nas doses de 50 e 250 μM . Notou-se que este efeito foi mais intenso na dose de 250 μM tanto de citrato de ródio livre como associado à nanopartículas (NPs) e especialmente nas linhagens celulares tumorais.

Em geral, foi notada redução na quantidade de citoplasma das células, o que levou à redução do tamanho das mesmas (Figura 1). Além disso, notou-se, que nos tratamentos realizados com as nanopartículas (RhCit-MGH) houve um acúmulo de NPs ao redor das células e em seu interior, mostrando que as nanopartículas são captadas pelas células.

Alterações morfológicas podem estar relacionadas a processos apoptóticos, pois, durante a apoptose, ocorre uma contração da célula, gerando perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas (GRIVICICH et al., 2007). Em nossos ensaios notamos redução do volume celular e tendência de redução de aderência célula-célula.

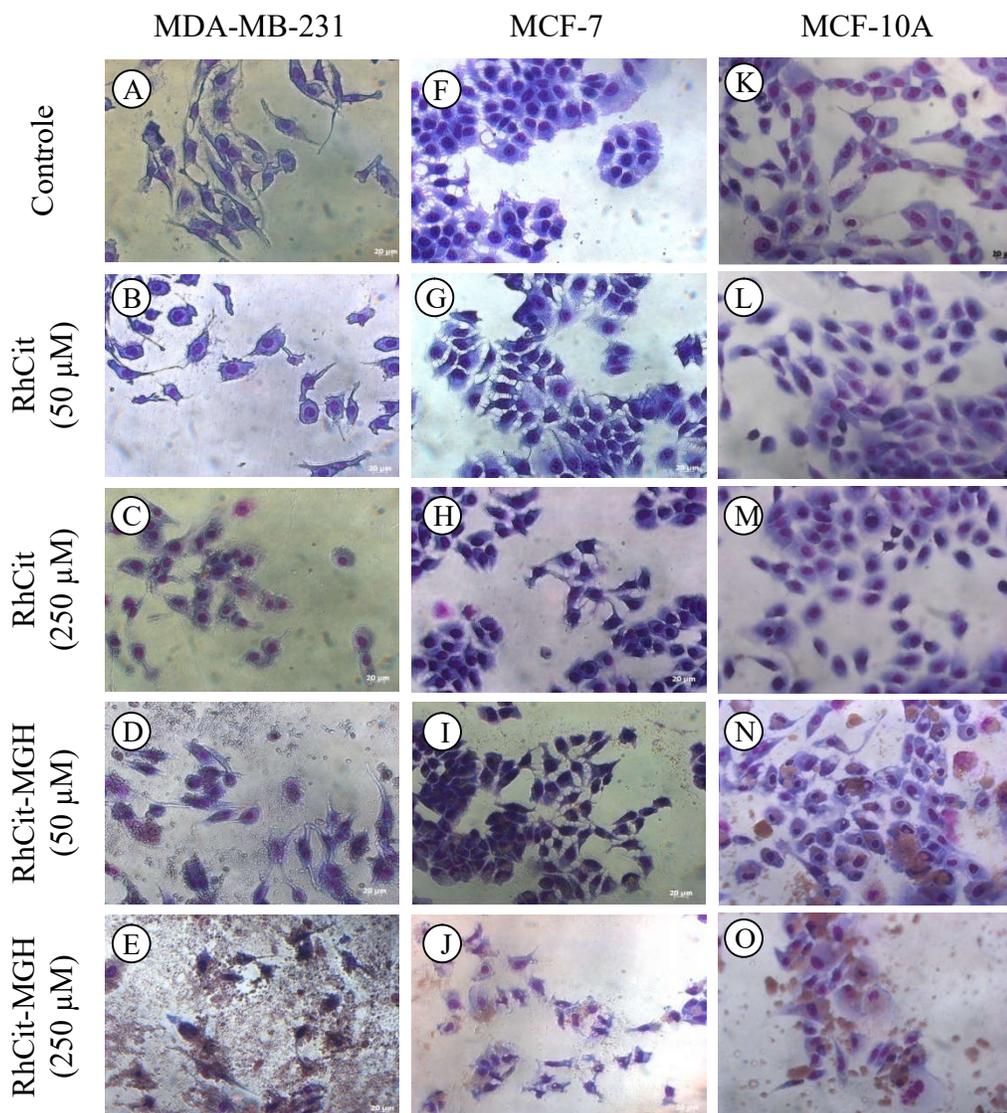


Figura 10: Alterações morfológicas induzidas por citrato de ródio (RhCit) e citrato de ródio associado à nanopartículas de maghemita (RhCit-MGH) em células de carcinoma mamário humano (MDA-MB-231 e MCF-7) e na linhagem não-tumoral (MCF-10A) após 48 horas de tratamento. As células foram incubadas com RhCit e RhCit-MGH nas doses de 50 e 250 µM e coradas através da afinidade eletiva das células por corantes ácidos ou básicos (kit de Corante Rápido para Hematologia InstantProv). As imagens foram obtidas por meio de microscópio de luz invertido com câmera acoplada. (A, F, K) Controle (células sem tratamento); (B, G, L) células tratadas com 50 µM de RhCit; (C, H, M) células tratadas com 250 µM de RhCit; (D, I, N) células tratadas com 50 µM de RhCit-MGH; (E, J, O) células tratadas do 250 µM de RhCit-MGH. Barra de escala: 20 µM.

5.2. Análise da Expressão de miR-34a

Na linhagem MDA-MB-231 observou-se que o nível de expressão de miR-34a teve um ligeiro aumento médio no grupo tratado (RhCit 250 µM) em relação ao grupo controle, enquanto que foi visto efeito contrário na linhagem MCF-7, em que o nível desse miRNA apresentou

redução média. Porém, estas alterações no nível de expressão gênica de mir-34a não foram significativas.

A literatura mostra que o miR-34a está pouco expresso em células de carcinoma mamário humano (MCF-7 e MDA-MB-231) em relação à linhagem saudável (MCF-10A) e que esse microRNA possui função de supressor tumoral (MACKIEWICZ *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2016). Alguns compostos naturais, como resveratrol, curcumina e berberina podem controlar a expressão de diversos microRNAs supressores tumorais em células cancerosas (MCCUBREY *et al.*, 2017). Porém, em nosso ensaio piloto não foi identificada alteração significativa na regulação deste gene após tratamento com RhCit.

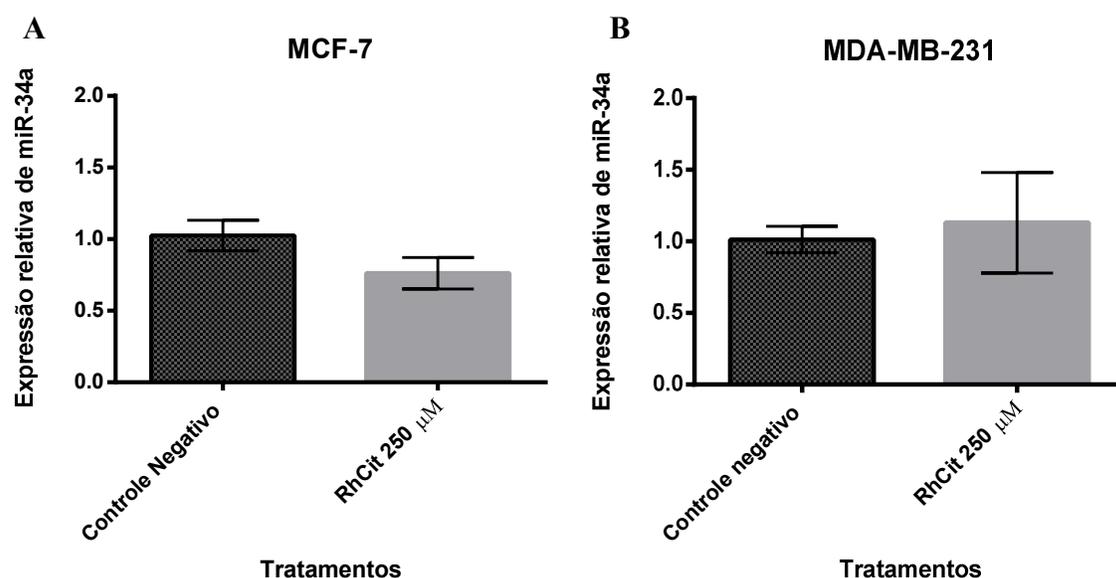


Figura 11: Análise da expressão de miR-34a nas linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7. A expressão relativa de miR-34a foi determinada por RT-qPCR e normalizada para o controle endógeno RNU6B. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo e expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos ao teste “t” de *student* e foi utilizado o programa *GraphPad Prism* (versão 7.0).

5.3. Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A foi avaliada após transfecção de miR-34a seguida do tratamento com RhCit-MGH (dose de 250 μ M) por 48 horas. Em todas as linhagens celulares investigadas houve redução significativa da viabilidade celular após 48 h de tratamento com RhCit-MGH e após tratamento com RhCit-MGH e *mimic* de miR34a (RhCit-MGH + miR34a) em relação ao controle negativo.

A linhagem MDA-MB-231 foi a que apresentou maior sensibilidade aos tratamentos supracitados, apresentando uma redução média da viabilidade de 66% ($\pm 1,4$). Contudo, a associação do microRNA (*mimic* de mir-34a) não alterou a viabilidade em relação ao tratamento exclusivamente com RhCit-MGH (Figura 12A). Desta forma, nesta avaliação, a transfecção com mir-34a associada ao tratamento com RhCit-MGH não resultou em maior efeito citotóxico do que o simples tratamento com RhCit-MGH ($p < 0,0001$).

Adicionalmente, verificou-se que a linhagem MCF-7 apresentou mais resistência aos tratamentos em relação à MDA-MB-231, já que o tratamento com RhCit-MGH provocou redução de apenas 22% ($\pm 1,7$) da viabilidade ($p < 0,001$). Todavia, a associação do miR-34a reduziu a viabilidade desta linhagem em 32% ($\pm 1,2$), redução significativa em relação ao tratamento exclusivo com RhCit-MGH (Figura 12B) ($p < 0,001$).

Na linhagem celular saudável, MCF-10A, foi notado efeito citotóxico similar ao encontrado na linhagem MDA-MB-231, ou seja, a transfecção com miR-34a associada ao tratamento com RhCit-MGH foi semelhante ao efeito citotóxico do tratamento exclusivo com RhCit-MGH (figura 12C) ($p < 0,0001$).

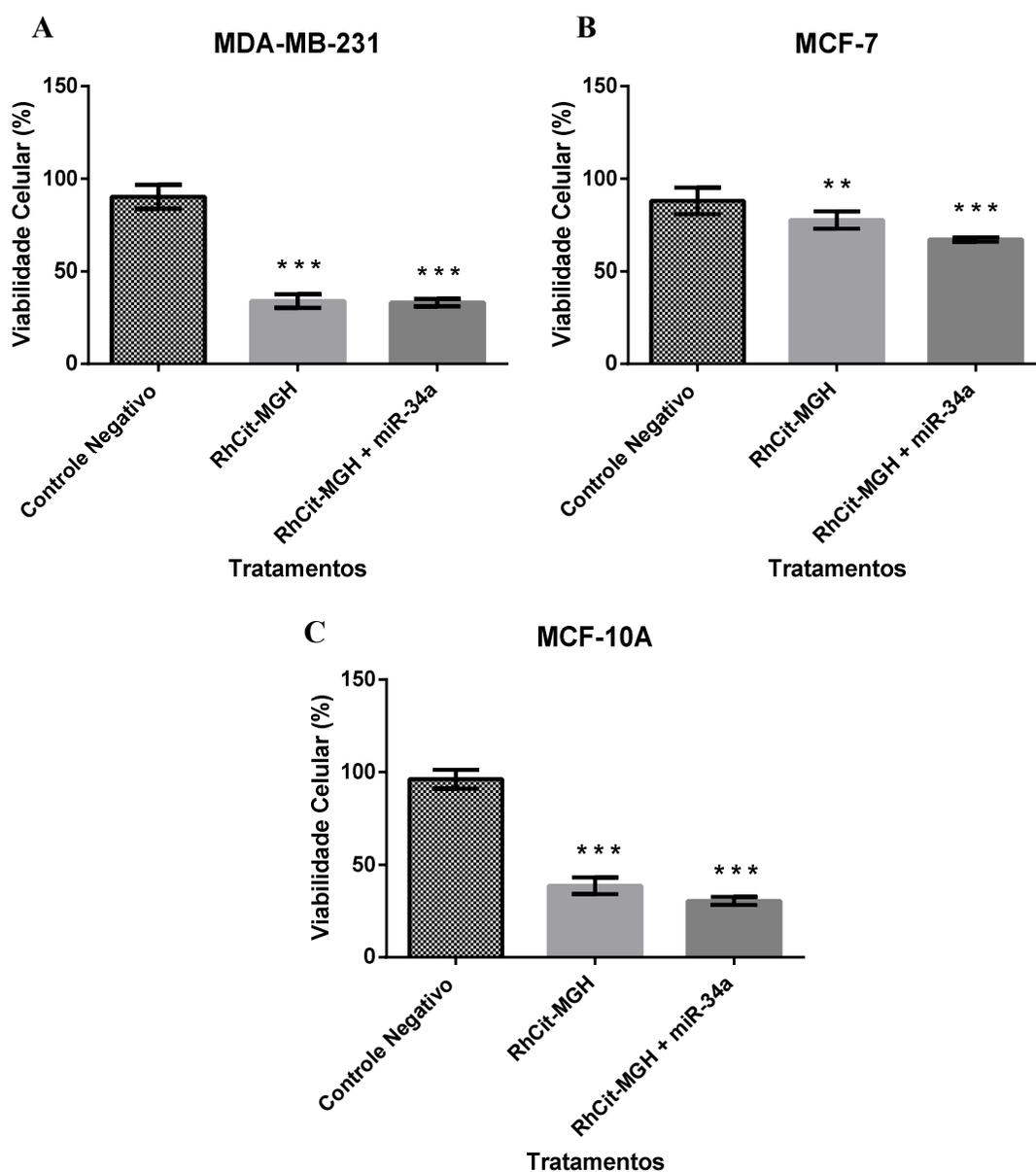


Figura 12: Viabilidade celular após tratamento por 48h com citrato de ródio associado à nanopartículas de maghemita (RhCit-MGH) e após transfecção com *mimics* de miR-34a seguida de tratamento com citrato de

ródio associado à nanopartículas de maghemita (RhCit-MGH + miR-34a) nas linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 e na linhagem não-tumoral MCF-10A. As células foram transfectadas com *mimics* de miR-34a por 24h antes do tratamento com RhCit-MGH. A viabilidade celular foi determinada por espectrofotometria após 3h de incubação com o reagente alamarBlue™ (Invitrogen) e a fluorescência foi determinada utilizando-se o comprimento de onda de 585 nm. Os grupos experimentais foram analisados em oito replicatas. Os resultados de viabilidade foram calculados com base no percentual de valores de fluorescência observados no grupo controle sem tratamento (NT). Os dados foram expressos como média ± 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). **representa $p < 0,001$ e *** representa $p < 0,0001$ comparados ao controle não-tratado.

Chaves e colaboradores (2015) demonstraram que RhCit-MGH reduziu significativamente a viabilidade de células MCF-7 nas doses de 200 e 300 μM de maneira dose-dependente com 24 horas de tratamento, enquanto que a viabilidade da linhagem MCF-10A não foi reduzida de forma significativa em nenhuma das doses, contrastando com nossos resultados, onde observamos que a linhagem tumoral MCF-7 apresentou maior resistência ao tratamento com RhCit-MGH por 48 horas na dose de 250 μM , enquanto que a linhagem saudável MCF-10A mostrou maior sensibilidade ao tratamento perdendo sua viabilidade de forma significativa.

É descrito na literatura que células de tumor mamário MCF-7 e MDA-MB-231 apresentam expressão diminuída de miR-34a quando comparadas à linhagem saudável do epitélio da mama (MCF-10A) (MACKIEWICZ *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2016). Este miRNA atua em diversas vias de sinalização controlando a proliferação celular (XU *et al.*, 2018). Estudos mostram que o miR-34a aumenta a sensibilidade ao paclitaxel em células de câncer de mama (KANG *et al.*, 2015) e à cisplatina em células de câncer de bexiga (LI *et al.*, 2014) e de câncer de pulmão (GU *et al.*, 2017).

Logo, esperava-se que a associação de miR-34a ao tratamento com RhCit-MGH reduzisse significativamente a viabilidade das células tumorais quando comparado ao grupo RhCit-MGH, visto o seu papel supressor tumoral. Porém, isso não ocorreu em nosso ensaio. Por outro lado, também não significa que este miR possua papel oncogênico, já que não houve aumento da viabilidade celular.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente trabalho, pode-se concluir que:

- RhCit e RhCit-MGH induziram alterações morfológicas especialmente em células de carcinoma mamário humano, de maneira dependente da dose, tais como redução na quantidade de citoplasma e no tamanho das células. Houve também acúmulo das nanopartículas ao redor e no interior das células.
- A expressão de miR-34a não foi alterada após o tratamento com RhCit tanto na linhagem MCF-7 como na MDA-MB-231.
- Os tratamentos com RhCit-MGH e RhCit-MGH associado a *mimics* de miR-34a induziram citotoxicidade nas três linhagens investigadas. Porém, notou-se que este efeito foi mais expressivo e semelhante entre as linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A.

Os resultados do atual estudo foram de fundamental importância para se compreender um pouco dos efeitos de RhCit, RhCit-MGH e miR-34a sobre células de tumor mamário e células saudáveis da mama, através de uma proposta inovadora que reúne nanotecnologia com RNAi, e necessita de mais estudos para melhor compreender os efeitos de RhCit e RhCit-MGH sobre o miR-34a e o efeito destes nas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATAH, TarekM.a. et al. The localization of pre mRNA splicing factor PRPF38B is a novel prognostic biomarker that may predict survival benefit of trastuzumab in patients with breast cancer overexpressing HER2. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 68, p.112245-112257, 18 nov. 2017.

BELKACEMI, Yazid et al. Local and Regional Breast Cancer Recurrences: Salvage Therapy Options in the New Era of Molecular Subtypes. **Frontiers In Oncology**, [s.l.], v. 8, 17 abr. 2018.

BELLINI, Elisa et al. Two-Stage Tissue-Expander Breast Reconstruction: A Focus on the Surgical Technique. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2017, p.1-8, 2017.

BERGMANN, A.; Mattos, I. E.; Koifman, R. J.; Koifman, S. Morbidade após o tratamento para câncer de mama. **Fisioterapia Brasil**, v.1, n. 2, p. 101-108, 2000.

CARNEIRO, Marcella Lb et al. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. **Journal Of Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 9, n. 1, 2011.

CARNEIRO, Marcella Lemos Brettas et al. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. **Journal Of Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 11, n. 1, 2013.

CHAUDHARY, Vrantika; JANGRA, Sumit; YADAV, NeelamR..Nanotechnology based approaches for detection and delivery of microRNA in healthcare and crop protection. **Journal Of Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 1, 13 abr. 2018.

CHAVES, N. L.; LOPES, C. A. P.; CARNEIRO, M. L. B. Rhodium Citrate Associated with Maghemite Nanoparticles Causes DNA Fragmentation Independently of Caspases 3 and Mediated by Reactive Oxygen Species. **Journal Of Nanomedicine & Nanotechnology**, [s.l.], v. 06, n. 05, 2015.

CHAVES, N.L. 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, p. 1000312, 2015.

CHAVES, Natalia et al. Exploring cellular uptake of iron oxide nanoparticles associated with rhodium citrate in breast cancer cells. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], v. 12, p.5511-5523, ago. 2017.

CHO, W.C.S. MicroRNAs in cancer translational Research. **Springer Science Business Media**. 2011.

DAVIDSON, B.L.; MCCRAY, P.B. Current prospects for RNA interference-based therapies.

Nature Reviews Genetics. v.12. p. 329-340. 2011.

FIRE, Andrew et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, [s.l.], v. 391, n. 6669, p.806-811, fev. 1998.

GONDI, Christopher S.; RAO, JastiS.. Concepts in in vivo siRNA delivery for cancer therapy. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 220, n. 2, p.285-291, ago. 2009.

GRIVICICH I., REGNER A., ROCHA A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GU, Li et al. A Combination RNAi-Chemotherapy Layer-by-Layer Nanoparticle for Systemic Targeting of KRAS/P53 with Cisplatin to Treat Non-Small Cell Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 23, n. 23, p.7312-7323, 14 set. 2017.

HASHEMI, Zahra Sadat et al. Inhibition of breast cancer metastasis by co-transfection of miR-31/193b-mimics. **Iranian Journal Of Basic Medical Sciences**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.1-2, abr. 2018.

HASSETT, Michael J. et al. Frequency and Cost of Chemotherapy-Related Serious Adverse Effects in a Population Sample of Women With Breast Cancer. **Jnci: Journal of the National Cancer Institute**, [s.l.], v. 98, n. 16, p.1108-1117, 16 ago. 2006.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 3. ed. Rio de Janeiro: Inca, 2017, 108 p.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2017.

IORIO, Marilena V. et al. Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. **The Breast**, [s.l.], v. 20, p.63-70, out. 2011.

ISRAEL, Bridg'ette et al. Phytochemicals: Current strategies for treating breast cancer (Review). **Oncology Letters**, [s.l.], p.7471-7478, 20 mar. 2018.

JUNEJA, Ridhima; ROY, Indrajit. Iron oxide-doped niosomes as drug carriers for magnetically targeted drug delivery. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], v. 13, p.7-9, mar. 2018.

JUNICKE, H. et al. A rhodium(III) complex for high-affinity DNA base-pair mismatch recognition. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 7, p.3737-3742, 27 fev. 2003.

KALIMUTHU, Kalishwaralal et al. Gold nanoparticles stabilize peptide-drug-conjugates for sustained targeted drug delivery to cancer cells. **Journal Of Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 1, 30 mar. 2018.

KANG, Le et al. MicroRNA-34a suppresses the breast cancer stem cell-like characteristics by downregulating Notch1 pathway. **Cancer Science**, [s.l.], v. 106, n. 6, p.700-708, jun. 2015.

KATSAROS, N.; ANAGNOSTOPOULOU, A.. Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. **Critical Reviews In Oncology/hematology**, [s.l.], v. 42, n. 3, p.297-308, jun. 2002.

KIM, do Yeon et al. A novel miR-34a target, protein kinase D1, stimulates cancer stemness and drug resistance through GSK3/β-catenin signaling in breast cancer. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.14791-14802, 17 fev. 2016.

KONG, Yi W et al. MicroRNAs in cancer management. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.249-258, jun. 2012.

KRELL, Jonathan et al. MiRNAs in breast cancer: ready for real time?. **Pharmacogenomics**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.709-719, abr. 2012.

LI, Heng et al. Cisplatin-induced epigenetic activation of miR-34a sensitizes bladder cancer cells to chemotherapy. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.8-9, 2014.

LIU, He et al. Signal amplification strategy for biomarkers: Structural origins of epitaxial-growth twinned nanocrystals and D-π-A type polymers. **Biosensors And Bioelectronics**, [s.l.], v. 109, p.184-189, jun. 2018.

LODYGIN, Dmitri et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. **Cell Cycle**, [s.l.], v. 7, n. 16, p.2591-2600, 15 ago. 2008.

MACKIEWICZ, Mark et al. Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA. **Breast Cancer Research And Treatment**, [s.l.], v. 130, n. 2, p.663-679, 4 ago. 2011.

MCCUBREY, James A. et al. Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs. **Aging**, [s.l.], p.1477-1536, 12 jun. 2017.

MELO, Sonia A.; ESTELLER, Manel. Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fire. **Febs Letters**, [s.l.], v. 585, n. 13, p.2087-2099, 11 ago. 2010

MISSO, Gabriella et al. Mir-34: A New Weapon Against Cancer?. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s.l.], v. 3, jan. 2014.

ROCHA, Márcia et al. Modulation of fibronectin and laminin expression by Rhodium (II) citrate-coated maghemite nanoparticles in mice bearing breast tumor. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, dez. 2017.

SHARMA, Shivani et al. ApoptomiRs of Breast Cancer: Basics to Clinics. **Frontiers In Genetics**, [s.l.], v. 7, 29 set. 2016.

TANG, Joy; AHMAD, Aamir; SARKAR, FazlulH.. The Role of MicroRNAs in Breast Cancer Migration, Invasion and Metastasis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 13, n. 12, p.13414-13437, 18 out. 2012.

TIEMANN, Katrin; ROSSI, John J.. RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. **Embo Molecular Medicine**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.142-151, jun. 2009.

TITZE-DE-ALMEIDA, Ricardo; DAVID, Catherine; TITZE-DE-ALMEIDA, Simoneide Souza. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 34, n. 7, p.1339-1363, 7 abr. 2017.

American Cancer Society. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html>>. Acesso em 30 de janeiro de 2018.

XU, Min et al. MicroRNA-34a Inhibition of the TLR Signaling Pathway Via CXCL10 Suppresses Breast Cancer Cell Invasion and Migration. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 3, p.1286-1304, 2018.

ZAIDI, Sahar et al. Efficacy of Complementary Therapies in the Quality of Life of Breast Cancer Survivors. **Frontiers In Oncology**, [s.l.], v. 7, 11 jan. 2018.

ZHANG, Li et al. Cytosolic co-delivery of miRNA-34a and docetaxel with core-shell nanocarriers via caveolae-mediated pathway for the treatment of metastatic breast cancer. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, p.46186-46187, 6 abr. 2017.

ZHANG, Zhong Ju; MA, Shi Liang. MiRNAs in breast cancer tumorigenesis (Review). **Oncology Reports**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.903-910, 23 dez. 2011.

ZYNGIER S.,KIMURA E., NAJJAR R. Antitumor effects of rhodium (II) citrate in mice bearing Ehrlich tumors. **Braz J MedBiol Res**. 1989; 22:397-401.