

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Camila Cristina Fraga Faraco

**Estudo da cinética da translocação do fator de crescimento
epidermal (EGF) para o núcleo e da sua localização subnuclear
em células-tronco mesenquimais e em células tumorais da
linhagem SK-HEP-1**

Belo Horizonte

2017

Camila Cristina Fraga Faraco

Estudo da cinética da translocação do fator de crescimento epidermal (EGF) para o núcleo e da sua localização subnuclear em células-tronco mesenquimais e em células tumorais da linhagem SK-HEP-1

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dawidson Assis Gomes

Coorientadora: Dr.^a Michele Angela Rodrigues

Belo Horizonte

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Sebastião e Maria José, por serem fundamentais na minha vida. Obrigada por tudo o que me proporcionaram, por serem meus maiores incentivadores e por fazerem parte de tudo o que conquisto e do que eu sou. Obrigada por serem meus exemplos de força, amor, persistência e fé e por estarem comigo além da vida. À Carla e à Carolina agradeço pelo apoio, pela cumplicidade, pelos conselhos, por me encorajarem a enfrentar desafios e mudanças e por estarem sempre comigo. Sou muito feliz por ter vocês como minhas irmãs e eternas amigas!

Agradeço ao meu marido, Matheus, pelo amor, pela compreensão e paciência, por me ajudar nas minhas decisões e confiar em mim mais do que ninguém, pelas discussões científicas e por todo o apoio que sempre me deu. Obrigada por ser meu companheiro para toda a vida e por me ajudar a ser uma pessoa melhor e mais feliz. Agradeço, também, à família que ele me deu: Jorge, Meire, Thales e Júlia. Obrigada por todo carinho, por me incentivarem a alcançar meus objetivos e pela presença constante. Ao Paulo e à Letícia, obrigada por também fazerem parte da minha família.

Ao meu orientador, Professor Dawidson, agradeço por ter me acolhido em seu laboratório, por ter sido compreensivo, atencioso e paciente, por ter me ensinado tantas coisas e pela oportunidade de desenvolver este trabalho e de participar do seu grupo de pesquisa. Agradeço à minha coorientadora, Michele, por toda a ajuda, pelos conselhos nos experimentos de imunofluorescência, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela atenção. A vocês dois, muito obrigada pela orientação e por terem participado efetivamente do meu desenvolvimento científico e profissional.

Aos meus queridos *lab friends*, agradeço por serem pessoas tão especiais, acolhedoras e pacientes. À Andrea, agradeço pelo “bom dia” alegre e incentivador de todas as manhãs, pelos vários momentos de risadas, pelos abraços confortantes, por todo carinho e atenção, pelas várias reflexões filosóficas sobre a vida e por me ajudar a ser uma pessoa mais dedicada e feliz. Agradeço à Jerusa por ter me incentivado a realizar o mestrado, por ter me acolhido como aprendiz e ter me ensinado a realizar cultura de células, por todos os conselhos, pela disponibilidade em ajudar sempre, por estar presente na minha vida mesmo de longe. Ao Marcelo, agradeço por não medir esforços para ajudar nos experimentos, na interpretação de dados e nas decisões futuras, por ser nosso conselheiro científico, por ter me ensinado e ajudado a realizar citometria de fluxo e ensaios celulares, e por me incentivar a aprender cada vez mais. Agradeço à Mariane por me ajudar a ser uma pessoa mais calma, tranquila e a não me deixar levar por preocupações não fundamentadas, por ter me ensinado e ajudado

com as diferenciações celulares e por contagiar a todos com seu jeito alegre de ser. À Marianna, agradeço por me ensinar tantas coisas, inclusive a realizar *Western blot* e imunofluorescência, por me auxiliar em vários experimentos e decisões, por me permitir compartilhar minhas dúvidas, angústias e também alegrias e por todos os sábios conselhos que me dá.

Ao Professor Alfredo, agradeço por todas as contribuições científicas para o projeto e por transmitir sua sabedoria e seu exemplo para todos os que têm a oportunidade de conviver com o grande mentor que ele é. A todos os meus amigos integrantes do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, agradeço por fazerem do nosso ambiente de trabalho um local de harmonia e de companheirismo. Betinha, Camila, Camila, Elis, Eliza, Joana, Joyce, Junnia, Luciana, Ludmila, Pricila, Thaís e Thalita: obrigada por toda ajuda, conselhos, carinho e amizade. À Lucie, agradeço pela ajuda com os experimentos e pela oportunidade de auxiliar no seu projeto.

Agradeço aos membros do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI), em especial à Nayara, pelos treinamentos e pelo auxílio com a microscopia de superresolução. Agradeço também aos membros do Centro de Microscopia, em especial às professoras Patrícia e Elizabeth, pela disciplina de Microscopia Eletrônica de Transmissão, e à Natália, Roberta, Altair e Denilson, pelo processamento das amostras e aquisição das imagens.

A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Bioquímica e Imunologia, agradeço por contribuírem para a minha formação profissional. À professora Glaura Franco, agradeço pelos ensinamentos de estatística. Aos colegas de bases, obrigada por toda a ajuda e pelas agradáveis discussões científicas.

Agradeço a todos os familiares que estão sempre presentes na minha vida e contribuem diariamente para meu crescimento. Obrigada por torcerem pelo meu sucesso e pela minha felicidade. Aos meus amigos de infância, obrigada por fazerem parte do meu amadurecimento, da minha vida e das minhas conquistas desde sempre. Aos meus amigos da Biologia e da UFMG, obrigada por compartilharem experiências e por serem tão compreensivos e atenciosos.

Agradeço às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo financiamento deste projeto e aos funcionários e pacientes da clínica STK – Núcleo de Cirurgia Plástica pelas amostras de tecido adiposo.

Acima de tudo, agradeço a Deus por todas essas pessoas que fazem parte da minha vida, por ter me dado forças e sabedoria para tomar as minhas decisões e por me guiar sempre.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 - Fator de crescimento epidermal (EGF) e seu receptor (EGFR).....	13
1.2 - Vias de sinalização ativadas por EGFR.....	16
1.3 - Translocação de EGFR para o núcleo	18
1.4 - EGFR e Câncer.....	21
1.5 - Envelope nuclear e Retículo Nucleoplasmático.....	24
1.6 – Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (hASC)	28
1.7 - Células SK-HEP-1.....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 - Objetivo Geral	32
3.2 - Objetivos Específicos	32
4. MÉTODOS.....	33
4.1 - Obtenção das células.....	33
4.2 - Cultivo das células	33
4.3 - Caracterização imunofenotípica das células	34
4.4 - Diferenciação das células em linhagem osteogênica	35
4.5 - Diferenciação das células em linhagem adipogênica	35
4.6 – Imunofluorescência	36
4.7 - Microscopia de superresolução.....	37
4.8 - Quantificação dos clusters de EGF	38
4.9 - Análises de colocalização	39
4.10 - Extração de proteínas totais.....	40
4.11 - <i>Western Blot</i>	41
4.12 - Microscopia Eletrônica de Transmissão	42
4.13 - Análises Estatísticas	43
5. RESULTADOS	44

5.1 - Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (hASC) e células da linhagem SK-HEP-1 expressam marcadores característicos de células-tronco mesenquimais (MSC).....	44
5.2 - hASC e SK-HEP-1 apresentam capacidade de diferenciação em linhagens mesenquimais.....	46
5.3 - A translocação do fator de crescimento epidermal (EGF) para o núcleo ocorre em hASC e em SK-HEP-1.....	49
5.4 - A cinética de translocação de EGF para o núcleo difere entre hASC e SK-HEP-1.....	49
5.5 - A síntese de EGFR nas células SK-HEP-1 é maior do que em hASC.....	53
5.6 - EGF se colocaliza com seu receptor (EGFR) em hASC e em SK-HEP-1.....	55
5.7 - O retículo nucleoplasmático está presente nas hASC e nas SK-HEP-1.....	56
5.8 - EGF tem distribuição difusa no núcleo e pode ser encontrado no retículo nucleoplasmático em hASC e em SK-HEP-1.....	59
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
9. ANEXOS.....	89
9.1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	89
9.2 – Termo de doação de material humano para pesquisa.....	90

RESUMO

O fator de crescimento epidermal (EGF) ativa, por interação com seu receptor (EGFR), vias de sinalização celulares importantes como: proliferação, migração, diferenciação e tumorigênese. Esse receptor pode ser encontrado no núcleo, onde exerce funções relacionadas à síntese e reparo de DNA, à regulação transcricional e a processos oncológicos. A presença de EGFR no núcleo tem sido associada a um pior prognóstico em pacientes com câncer e ao desenvolvimento de resistência aos tratamentos. Modelos que caracterizam a translocação do receptor estimulado por ligante para o núcleo foram estabelecidos. No entanto, a cinética dessa translocação e a sua comparação entre diferentes tipos celulares tem sido pouco estudada. Os componentes nucleares envolvidos nesse tráfego também foram pouco explorados. Diante disso, avaliamos a cinética de translocação do EGF para o núcleo em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (hASC) e em células tumorais SK-HEP-1, linhagem com características mesenquimais. Células estimuladas por 5, 10, 20 e 40 minutos com EGF conjugado a Alexa Fluor[®] 488 foram analisadas por microscopia de superresolução, e imagens de seções ópticas em série foram adquiridas para a quantificação do número e do volume de *clusters* (aglomerados) de EGF no núcleo em cada tempo. Foi observado que a cinética de translocação difere entre os dois tipos celulares, uma vez que as hASC aparentam atingir equilíbrio de translocação em 10 minutos de estímulo, enquanto nas SK-HEP-1 a translocação continua ocorrendo em tempos posteriores. Verificamos que os clusters de EGF parecem se aglomerar no núcleo com o aumento do tempo de estímulo, o que sugere localizações subnucleares específicas para esse seu receptor. Ao analisarmos a presença de EGF em duas organelas nucleares, o retículo nucleoplasmático e o nucléolo, observamos que alguns clusters se localizam em ambas. Essa análise sugere que o retículo nucleoplasmático esteja envolvido no mecanismo de translocação de EGFR para o núcleo e que este receptor desempenhe funções específicas no nucléolo. Outros clusters se encontram distribuídos difusamente no nucleoplasma, o que sugere que o EGFR possa estar em outras organelas nucleares. Os resultados indicam que o estudo da translocação do EGF e de sua localização subnuclear em diferentes células pode contribuir para desvendar mecanismos associados às funções que seu receptor ativado desempenham no núcleo.

Palavras-chave: Fator de crescimento epidermal; cinética; translocação; núcleo; retículo nucleoplasmático.

ABSTRACT

By interacting with its receptor (EGFR), epidermal growth factor (EGF) activates cell signaling pathways involving proliferation, migration, differentiation and tumorigenesis. This receptor can be found in cell nucleus, where it has functions in DNA synthesis and repair, transcriptional regulation and oncological processes. Nuclear EGFR has been associated with a worse prognosis and with treatment resistance in cancer patients. Models that characterize the translocation of ligand-stimulated receptor to the nucleus have been established. However, the kinetics of this translocation and its comparison between different cell types is not well studied. Furthermore, little is known about the nuclear components involved in this traffic. Thus, we evaluated the EGF translocation kinetics to the nucleus in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hASC) and in SK-HEP-1 tumor cells, which have mesenchymal characteristics. Cells were stimulated by EGF conjugated to Alexa Fluor[®] 488 for 5, 10, 20 and 40 minutes and they were analyzed by superresolution microscopy. Images of serial optical sections were acquired to quantify the number and volume of EGF clusters in the nucleus at each stimulation time. We observed that the kinetics of EGF translocation differs between the two cell types, since hASC appear to achieve translocation equilibrium within 10 minutes of stimulation while in SK-HEP-1 cells the translocation continues to occur at later times. We verified that EGF clusters appear to assemble in the cell nucleus at later times, which suggests specific subnuclear localizations for this receptor. When we analyzed the presence of EGF in two nuclear organelles, the nucleoplasmic reticulum and the nucleolus, we observed that some clusters are located in both. This suggests that the nucleoplasmic reticulum may be involved in the mechanism of EGFR translocation to the nucleus and that this receptor performs specific functions in the nucleolus. Some clusters were diffusely scattered in the nucleoplasm, suggesting that EGFR may also be in other nuclear organelles. These results indicate that the study of EGF translocation and its subnuclear localization in different cell types can contribute to unravel mechanisms related to EGFR functions in the cell nucleus.

Key-words: Epidermal Growth Factor; kinetics; translocation; nucleus; nucleoplasmic reticulum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do EGFR e do domínio EGF dos ligantes da família ERBB (Adaptada de LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014).	1515
Figura 2: Modelos de translocação de EGFR para o núcleo.	200
Figura 3: Representação do retículo nucleoplasmático tipos I e II (adaptado de MALHAS; GOULBOURNE; VAUX, 2011).	2626
Figura 4: Exemplo da análise de colocalização realizada pelo software ZEN <i>lite Black edition</i>	400
Figura 5: Modelos celulares.	444
Figura 6: hASC e SK-HEP-1 expressam marcadores de superfície característicos de células-tronco mesenquimais.	45
Figura 7: hASC e SK-HEP-1 possuem capacidade de diferenciação osteogênica.	47
Figura 8: Capacidade de diferenciação em linhagem adipogênica é verificada em hASC, mas não em SK-HEP-1.	48
Figura 9: EGF transloca-se para o núcleo em hASC e em SK-HEP-1.	500
Figura 10: Reconstrução em 3D do núcleo de células estimuladas com EGF.	511
Figura 11: <i>Clusters</i> de EGF nuclear em hASC têm maior volume médio em 40 minutos de estímulo e não diferem em número e volume total entre 10, 20 e 40 minutos de estímulo.	544
Figura 12: <i>Clusters</i> de EGF nuclear em SK-HEP-1 não diferem em número entre 10, 20 e 40 minutos de estímulo e têm maior volume médio e total em 20 e 40 minutos de estímulo.	544
Figura 13: Perfil da cinética de translocação de EGF para o núcleo difere entre hASC e SK-HEP-1.	55
Figura 14: SK-HEP-1 produz maior quantidade de EGFR do que hASC.	55
Figura 15: EGF se colocaliza com seu receptor (EGFR) em hASC e em SK-HEP-1.	57
Figura 16: Reticulo nucleoplasmático em hASC.	58
Figura 17: Reticulo nucleoplasmático em SK-HEP-1.	58
Figura 18: SK-HEP-1 apresenta invaginações do retículo nucleoplasmático visualmente em maior quantidade e profundidade do que hASC.	600
Figura 19: EGF nuclear está presente no retículo nucleoplasmático e nucléolo.	611

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados para imunofluorescência.....	37
Tabela 2: Expressão de marcadores de superfície pelas hASC.....	46
Tabela 3: Expressão de marcadores de superfície pelas células SK-HEP-1.....	46
Tabela 4: Parâmetros quantitativos dos <i>clusters</i> de EGF nuclear para cada tempo de estímulo em hASC e em SK-HEP-1.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ARG	<i>Amphiregulin</i>	Anfiregulina
BRCA	<i>Breast cancer protein</i>	Proteína câncer de mama
BTC	<i>Betacellulin</i>	Beta celulina
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	Cluster de diferenciação
C-MET	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>	Receptor do fator de crescimento hepático
CRM1	<i>Chromosomal maintenance 1</i>	Manutenção cromossômica 1
CSC	<i>Cancer stem cells</i>	Células-tronco tumorais
CTD	<i>Carboxy-terminal domain</i>	Domínio carboxi-terminal
DAG	<i>Diacylglycerol</i>	Diacilglicerol
DNAPK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>	Proteína cinase dependente do DNA
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	Fator de crescimento epidermal
EGF-488	<i>Epidermal growth factor, biotinylated, complexed to Alexa Fluor® 488 streptavidin</i>	EGF biotilado complexado a Alexa Fluor® 488 estreptavidina
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	Receptor do fator de crescimento epidermal
EGN	<i>Epigen</i>	Epígeno
EN	<i>Nuclear envelope</i>	Envelope nuclear
EPR	<i>Epiregulin</i>	Epiregulina
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>	Retículo endoplasmático
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>	Cinase regulada por sinal extracelular
FABP4	<i>Fatty acid-binding protein 4</i>	Proteína que se liga a ácidos graxos 4
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
HBEGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>	Fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina
Hsp70	<i>70 kDa heat shock proteins</i>	Proteína do choque térmico de 70 kDa
INM	<i>Inner nuclear membrane</i>	Membrana nuclear interna
iNOS	<i>Inducible Nitric oxide synthase</i>	Óxido nítrico sintase indutível

INTERNET	<i>Integral trafficking from the ER to the NE transport</i>	Via de transporte integral do ER para o envelope nuclear
Ins(1,4,5)P3	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate</i>	Inositol 1,4,5-trisfosfato
IP3KB	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase isoform beta</i>	Inositol 1,4,5-trifosfato 3-cinase isoforma beta
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinases</i>	Proteínas cinases ativadas por mitógeno
MAPKK	<i>Mitogen activated protein kinase kinase</i>	Proteína cinase cinase ativada por mitógeno
MET	<i>Transmission electron microscopy</i>	Microscopia eletrônica de transmissão
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i>	Células-tronco mesenquimais
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>	Câncer de pulmão de células não pequenas
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>	Sinal de localização nuclear
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>	Complexo do poro nuclear
NRG	<i>Neuroregulins</i>	Neuroregulina
ONM	<i>Outer nuclear membrane</i>	Membrana nuclear externa
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	Antígeno nuclear de proliferação celular
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinases</i>	Fosfatidilinositol 3-cinase
PKC	<i>Protein kinase C</i>	Proteína cinase C
PLA	<i>Processed lipoaspirate cells</i>	Células de lipoaspirado processado
PLC	<i>Phospholipase C</i>	Fosfolipases C
PTB	<i>Phosphotyrosine binding domain</i>	Domínio de ligação a fosfotirosinas
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	Receptor ativado por proliferador de peroxisomo gama
PtdIns(4,5)P₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PtdIns(3,4,5)P₃	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</i>	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

RN	<i>Nucleoplasmic reticulum</i>	Retículo nucleoplasmático
RTK	<i>Tyrosine kinase receptor</i>	Receptor tirosina cinase
SH2	<i>Src homology 2 domain</i>	Domínio homólogo ao Src 2
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>	Pequenos RNAs de interferência
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>	Proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição
TBST	<i>Tris-buffered saline solution with Tween[®] 20</i>	Solução salina tamponada com Tris contendo Tween [®] 20
TKD	<i>Tyrosine kinase domain</i>	Domínio tirosina cinase
TKI	<i>Tyrosine kinase inhibitor</i>	Inibidor de tirosina cinase
TGF-α	<i>Transforming growth factor alpha</i>	Fator de crescimento transformante alfa

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Fator de crescimento epidermal (EGF) e seu receptor (EGFR)

Stanley Cohen, em 1962, observou que, ao injetar em camundongos neonatos extratos de glândulas salivares de camundongos, a abertura das pálpebras e o surgimento de dentes ocorria precocemente em relação aos neonatos não injetados (COHEN, 1962). O fator isolado por ele, responsável por esse fenômeno, foi denominado fator de crescimento epidermal (EGF) e teve sua estrutura primária determinada. O EGF é um polipeptídeo de cadeia única com a presença de seis resíduos de cisteína formadores de três pontes dissulfeto (SAVAGE; INAGAMI; COHEN, 1972). Estudos pioneiros verificaram que o EGF estimula o crescimento e queratinização de células epidermais (COHEN, 1965; COHEN; ELLIOTT, 1963), ativa a proliferação de células epiteliais de glândula mamária e de carcinoma mamário *in vitro* (TURKINGTON, 1969a; TURKINGTON, 1969b) e promove alterações metabólicas em células epidermais, como estímulo da síntese proteica e do transporte de metabólitos (COHEN, 1972). Em 1975, o EGF foi isolado de humanos pela primeira vez e foi verificado que sua estrutura e funções biológicas eram similares às observadas para o EGF de camundongo, estimulando o crescimento de fibroblastos de pele humana e de células do epitélio da córnea (COHEN; CARPENTER, 1975). Funções do EGF na diferenciação celular (SUNDELL et al., 1980) e na carcinogênese (STOSCHECK; KING, 1986) também foram descritas.

Em experimentos com EGF humano marcado com ¹²⁵I, Carpenter sugeriu que o EGF é capaz de se ligar a receptores de superfície cuja estrutura não é irreversivelmente alterada por essa ligação. Após a associação do EGF à superfície celular, verificou-se que ele é internalizado e degradado por um processo dependente de energia e que, ao mesmo tempo, ligantes não são capazes de se associar a outros receptores da superfície (CARPENTER; COHEN, 1976). Numa análise cinética da internalização do EGF marcado, foi confirmada sua ligação à membrana plasmática por microscopia eletrônica, e foi observado que ele se localizava progressivamente em estruturas lisossomais, o que sugeriu um processo de degradação lisossomal do ligante associado ao receptor (GORDEN et al., 1978).

Posteriormente, o receptor ao qual o EGF se liga (EGFR) foi purificado, e observou-se que ele possuía atividade tirosina cinase e capacidade de autofosforilação (COHEN; FAVA; SAWYER, 1982; COHEN et al., 1982; USHIRO; COHEN, 1980). Em 1984, Downward e colaboradores obtiveram a sequência de aminoácidos de peptídeos do EGFR e verificaram que sua composição era similar à

sequência do oncogene v-erb-B do vírus da eritroblastose aviária (DOWNWARD et al., 1984). Alguns meses depois, Ullrich e colaboradores determinaram a sequência de aminoácidos completa do EGFR, o que possibilitou a predição de sua estrutura e do seu mecanismo de transdução de sinal (ULLRICH et al., 1984).

O EGFR é classificado como um receptor tirosina cinase (RTK) da família ERBB, (ou HER em humanos), da qual também fazem parte o ERBB2 (HER2 ou NEU), ERBB3 (HER3) e ERBB4 (HER4) (CITRI; YARDEN, 2006). Esses receptores são expressos em células de origem ectodérmica e mesodérmica e desencadeiam sinais para adesão, migração, proliferação, organogênese e oncogênese (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001). A depleção de tais receptores em camundongos gerou anormalidades cardíacas, neurais e epiteliais, levando à morte embrionária ou pós-natal (SIBILIA et al., 2007). Os ERBBs apresentam estrutura, mecanismo de ativação e funções semelhantes, participando de uma rede de sinalização na qual a ativação dos componentes e a interação entre eles está relacionada ao contexto biológico da célula (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001).

A estrutura do EGFR é definida por: uma região extracelular, na qual ocorre a associação do ligante; uma região citoplasmática, com atividade tirosina-cinase, e um domínio transmembrana entre as duas regiões (ULLRICH et al., 1984). A região extracelular (com, aproximadamente, 620 resíduos de aminoácidos) possui 4 domínios, dos quais os domínios I e III formam o sítio de ancoragem dos ligantes (LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014). A região intracelular do EGFR (com, aproximadamente, 540 resíduos de aminoácidos) é composta por um domínio tirosina cinase (TKD) e um domínio carboxi-terminal (CTD) com resíduos de tirosina (LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014). A estrutura esquemática do EGFR está representada na figura 1A.

Os ligantes da família dos ERBB são caracterizados por possuírem um motivo de 50 aminoácidos (domínio EGF, representado na figura 1B) e três alças moleculares formadas por pontes dissulfeto. Os precursores de tais ligantes são clivados por metaloproteases que geram sua conformação ativa, capaz de se associar ao receptor (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001). Dos 11 ligantes de ERBBs, 7 são capazes de ativar o EGFR (figura 1B). Estes são: EGF, anfiregulina (ARG), β -celulina (BTC), epígeno (EGN), epiregulina (EPR), fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) e fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina (HB-EGF) (HARRIS; CHUNG; COFFEY, 2003).

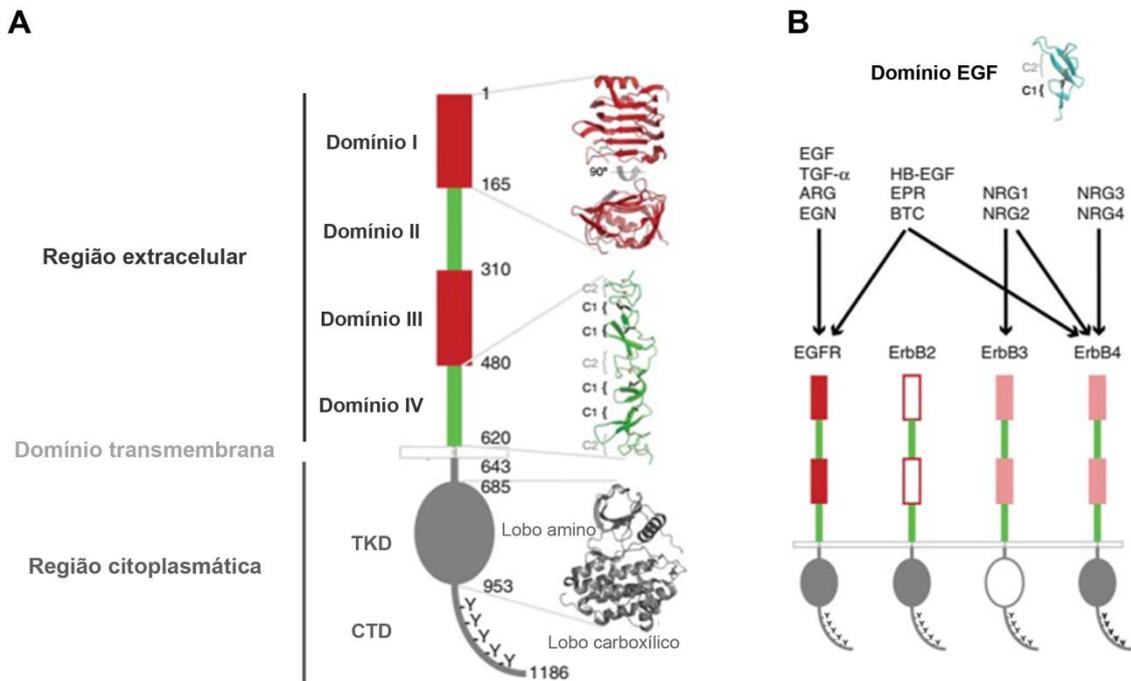


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do EGFR e do domínio EGF dos ligantes da família ERBB (Adaptada de LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014). **A-** Domínios do EGFR. A região extracelular é composta pelos domínios I, II, III e IV, sendo que os domínios I e III apresentam estrutura semelhante (representada pelo domínio I) e formam o sítio de ancoragem dos ligantes. Os domínios II e IV, cuja estrutura é representada pelo domínio IV, também se assemelham em relação à sequência de aminoácidos. A região citoplasmática é composta pelo domínio tirosina cinase (TKD) representado estruturalmente, e pelo domínio carboxi-terminal (CTD) com resíduos de tirosina. Entre a região extracelular e citoplasmática, observa-se o domínio transmembrana. Os números ao lado do esquema representativo indicam a posição dos aminoácidos que limitam cada domínio. **B-** Ligantes da família dos ERBB. Dos 11 apresentados, 7 (EGF: fator de crescimento epidermal; TGF- α : fator de crescimento transformante alfa; ARG: anfiregulina; EGN: epígeno; HB-EGF: fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina; EPR: epiregulina; BTC: β -celulina) podem se ligar ao EGFR. O receptor ERBB2 não apresenta ligante conhecido e o receptor ERBB3 possui TKD alterado, o que compromete sua atividade enzimática. Todos os ligantes ERBB apresentam o domínio EGF, cuja estrutura está representada na parte superior da figura. C1 e C2 correspondem a dois modelos de ponte dissulfeto. Em C1, uma única ponte dissulfeto forma uma alça em laço, e em C2, duas pontes dissulfeto ligam 4 resíduos de cisteína. NRG: neuroregulinas.

A associação do ligante promove mudanças conformacionais nos domínios extracelulares do receptor, as quais culminam na projeção do braço de dimerização do domínio II e em sua estabilização (DAWSON et al., 2005). Esse processo promove a formação de homodímeros de receptores EGFR ou de heterodímeros entre EGFR e outros receptores ERBB (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001). A associação de receptores leva à formação de dímeros assimétricos dos domínios tirosina cinase. Nesse dímero, o lobo carboxílico de um TKD (ativador) interage com o lobo amino do outro TKD (receptor), levando à transição deste para uma forma ativa. O receptor, por sua vez, fosforila resíduos de tirosina do CTD do ativador, levando à ativação do receptor por autotransfosforilação (ZHANG et al., 2006; LEMMON; SCHLESSINGER;

FERGUSON, 2014). A sinalização intracelular gerada por essa ativação é dependente do ligante que se associou ao EGFR, do dímero formado, dos resíduos fosforilados e das moléculas efetoras capazes de propagar ou regular esse sinal (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001).

1.2 - Vias de sinalização ativadas por EGFR

Após a autofosforilação do EGFR, moléculas adaptadoras se ancoram aos resíduos fosforilados no CTD do receptor e desencadeiam a ativação de vias de sinalização intracelulares. Essas moléculas são proteínas com domínio homólogo ao Src (SH2) ou com domínio de ligação a fosfotirosinas (PTB) que promovem o recrutamento de componentes de vias classicamente envolvidas na sinalização por RTKs (SCHULZE; DENG; MANN, 2005). Essas vias têm papel importante no ciclo, proliferação, diferenciação e migração celular.

Uma das vias que pode ser desencadeada por EGFR é a das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição (STAT), cujas proteínas STAT 1, 3 e 5 são ativadas pelo receptor (DAVID et al., 1996). Por meio do domínio SH2, as STATs se ligam diretamente ao EGFR ativado e são fosforiladas por ele. Em uma via indireta, proteínas cinases Src podem ativá-las após estímulo por ligante. Após fosforiladas, as STATs se dimerizam e translocam para o núcleo para regular a transcrição gênica ou outros fatores de transcrição, como *c-fos* e *c-jun*, promovendo proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (QUESNELLE; BOEHM; GRANDIS, 2007).

A via das fosfolipases C (PLC) também pode ser ativada por EGFR. A ligação de PLC γ 1 pelo seu domínio SH2 a resíduos de tirosina fosforilados do EGFR leva à sua ativação mediada por esse receptor (MARGOLIS et al., 1990); (ROTIN et al., 1992). A PLC γ 1 ativada catalisa a clivagem de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (Ins(1,4,5)P₃). Este se liga a receptores no retículo endoplasmático e leva à liberação dos estoques de Ca²⁺ intracelulares (PATTERSON et al., 2005). Esse íon se liga à proteína calmodulina e ativa proteínas cinases dependentes de Ca²⁺/calmodulina (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003). O DAG é cofator de ativação de proteínas da família da proteína cinase C (PKC), que também são ativadas por cálcio (SCHLESSINGER, 2000).

Outra via clássica ativada por EGFR e outros receptores tirosina cinase é a via da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K). Ativada por meio da ligação direta ou mediada por proteínas adaptadoras (IRS1 e Gab1) a resíduos fosforilados do receptor, a PI3K fosforila PtdIns(4,5)P₂ a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃), que recruta

proteínas sinalizadoras, como Akt, para a membrana, ativando-as por fosforilação (SARBASSOV et al., 2005). A Akt está envolvida na inibição da apoptose por inativação de fatores pró-apoptóticos e ativação de fatores antiapoptóticos. Além disso, ela medeia a ativação de rapamicina, que promove fosforilação de proteínas envolvidas na tradução, na formação de ribossomos e no crescimento celular (SCHLESSINGER, 2000; LI et al., 2016).

A via das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK) também pode ser desencadeada por EGFR. A molécula adaptadora Grb, complexada a um fator de troca de guanina denominado Sos, se liga a resíduos de tirosina fosforilados no receptor, diretamente ou por meio de outra proteína adaptadora, Shc. Essa interação leva à aproximação entre Sos e Ras, o que estimula a ativação de Ras. Ras ativa Raf, que fosforila MAP-cinase-cinase (MAPKK), e esta então fosforila MAPK (ERK) para sua ativação. ERK ativa substratos citoplasmáticos e nucleares, regulando processos metabólicos e proliferativos (MCKAY; MORRISON, 2007; SCHLESSINGER, 2000).

A internalização do EGFR é importante para regular a sinalização por ele desencadeada. Desde a sua descoberta, tem sido observado que o receptor se redistribui na membrana após associação do ligante e são endocitados em vesículas revestidas no interior da célula (HAIGLER; MCKANNA; COHEN, 1979; GORDEN et al., 1978). Desses endossomos primários, o EGFR pode retornar à membrana plasmática ou pode ser destinado a endossomos tardios, os quais se associam a lisossomos para degradação (SORKIN; VON ZASTROW, 2009; AVRAHAM; YARDEN, 2011). A internalização do EGFR, além de ser importante para o controle da sinalização e reciclagem do receptor, leva ao seu transporte para outros compartimentos celulares, como a mitocôndria (DEMORY et al., 2009), o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático (ER) e o núcleo (WANG; HUNG, 2012).

No núcleo, o EGFR pode promover proliferação, síntese e reparo de DNA e progressão tumoral, por atuar na regulação transcricional, na transdução de sinal e por interagir com outras proteínas nucleares (LEE; WANG; HUNG, 2015). Como regulador transcricional, o terminal carboxílico do EGFR promove transativação de genes envolvidos com tumorigênese, instabilidade cromossômica, resistência a drogas e inflamação, via associação com outras proteínas que se ligam ao DNA (LEE; WANG; HUNG, 2015). Dentre os genes regulados por EGFR nuclear estão: Aurora-A (HUNG et al., 2008), iNOS (LO et al., 2005a), ciclina D1 (LIN et al., 2001), ciclooxigenase 2 (LO et al., 2010) proteína do câncer de mama (BRCA) (HUANG et al., 2011), timidilato sintase (KIM et al., 2009) e STAT 1 (HAN et al., 2013).

Um dos exemplos do EGFR nuclear como sinalizador via atividade cinase está na sua capacidade de mediar a fosforilação do antígeno nuclear de proliferação celular

(PCNA), o que aumenta a estabilidade deste na interação com a cromatina e a consequente eficiência do metabolismo do DNA (WANG et al., 2006). O EGFR também é capaz de mediar modificações pós-traducionais na cromatina, como a metilação da histona H4, importante para a regulação da síntese de DNA e para o reparo de quebra de dupla fita (CHOU et al., 2014). Além de sinalizador, o EGFR nuclear pode estabelecer interações com proteínas, como a proteína cinase dependente de DNA (DNAPK), molécula que participa do reparo de DNA por quebra de dupla fita e do reparo de DNA por junção não homóloga. Essa interação é ativada por fatores que causam danos ao DNA, como tratamento com cisplatina, radiação ionizante e luz ultravioleta (DITTMANN et al., 2005; LICCARDI; HARTLEY; HOCHHAUSER, 2011).

Além dessas funções, o EGFR nuclear poderia participar da sinalização de cálcio no núcleo, uma vez que esse cálcio, além de estar envolvido na ativação de fatores de transcrição e de proteínas cinases, regula a proliferação celular de várias linhagens, o que foi mostrado em experimentos *in vitro* e *in vivo* (RODRIGUES et al., 2007). Componentes da via de sinalização de cálcio, como PtdIns(4,5)P₂, PLC e Ins(1,4,5)P₃ estão presentes no núcleo (GOMES et al., 2008). A translocação do EGFR para o núcleo poderia, portanto, ativar a maquinaria que leva à sinalização de cálcio nuclear, como foi verificado para os receptores de insulina (RODRIGUES et al., 2008) e do fator de crescimento hepático (GOMES et al., 2008) após associação dos seus respectivos ligantes.

1.3 - Translocação de EGFR para o núcleo

O transporte de EGFR para o núcleo é ativado por associação do ligante ou por mecanismos que geram danos à célula, como radiação ionizante, tratamento com cisplatina, radiação ultravioleta e estresse oxidativo ou térmico (DITTMANN et al., 2005; XU et al., 2009; DITTMANN et al., 2011; WANG; HUNG, 2012). Entre seis ligantes desse receptor testados, quatro (EGF, HB-EGF, TGF- α e BTC) ativam a translocação de EGFR para o núcleo e estão associados ao aumento da fosforilação de resíduos de tirosina e da capacidade migratória de células SK-HEP-1 (FARIA et al., 2016). Alguns ligantes, como EGF, TGF α e HB-EGF, também foram encontrados no núcleo, o que sugere que a associação com seus receptores também possa ocorrer nesse compartimento (WANG; HUNG, 2012).

Um dos primeiros trabalhos que confirmaram a presença de EGFR no núcleo foi desenvolvido pelo grupo de Hung e colaboradores, em 2001. Nele foi demonstrado que o EGFR nuclear ocorre em maior quantidade em tecidos com alta capacidade de

proliferação, como o útero de camundongos grávidos, embriões de camundongo e tecidos de câncer oral e de mama humanos. Isso também foi verificado para células de linhagens tumorais humanas, observadas por microscopia confocal. O estímulo dessas linhagens com EGF levou ao aumento de EGFR nuclear, que estava ativado por fosforilação e que era proveniente da membrana plasmática, o que sugeria um mecanismo de translocação desse receptor para o núcleo (LIN et al., 2001).

O estudo de Lo e colaboradores em 2006 verificou que o EGFR interage com importina $\beta 1$ (proteína de transporte nuclear), e que o sinal de localização nuclear (NLS) presente na estrutura do EGFR é importante para essa interação e para a translocação do receptor para o núcleo. Os autores também observaram que a internalização de EGFR por endocitose é necessária para essa translocação, e sugeriram que vesículas endocíticas participem dela. Além disso, foi observado que o receptor interage com a exportina CRM1, a qual pode estar associada à translocação do EGFR do núcleo para o citoplasma (LO et al., 2006). Mais tarde, Hsu e colaboradores caracterizaram dois NLS tripartidos na região justamembranar do EGFR, necessários para a translocação desse receptor para o núcleo (HSU; HUNG, 2007).

Em 2007, Liao e colaboradores sugeriram uma via pela qual o EGFR, após o estímulo com EGF, é translocado para o retículo endoplasmático, onde se associa com o translocon Sec61 e é retrotranslocado para o citoplasma. Essa retrotranslocação é dependente da proteína citoplasmática Hsp70 e é importante para a função do EGFR como ativador da expressão de ciclina D1. Como o EGFR recuperado no núcleo é extraído por tampões sem detergente e com alta concentração de sal e, por isso, não está associado à membrana, os autores sugerem que a retrotranslocação por Sec61 seja um mecanismo para a extração do receptor da membrana (LIAO; CARPENTER, 2007). O modelo de translocação de EGFR para o núcleo sugerido pelo estudo é mostrado na figura 2A.

Apesar de ter sido proposto que, durante a translocação do EGFR, ocorre um transporte retrógrado do complexo de Golgi para o ER, essa evidência só foi verificada em 2010 por Wang e colaboradores. Foi observado que, nessas organelas, o EGFR tem o N-terminal voltado para o lúmen e o C-terminal voltado para o citoplasma, o que sugere um transporte vesicular envolvido na translocação do receptor. Os autores mostraram que o transporte de EGFR de Golgi para o ER é dependente de vesículas revestidas por COPI, uma vez que a inibição de COPI ou mutação de ARF (GTPase de COPI) diminuem os níveis de EGFR no ER e no núcleo. EGFR interage com a subunidade gama de COPI, e quando essa subunidade é depletada por siRNA, há diminuição dos níveis nucleares de EGFR. Em resumo, o estudo sugere que a

translocação de EGFR para o núcleo é regulada pelo transporte retrógrado de Golgi para o ER por meio de vesículas revestidas por COPI (WANG et al., 2010a).

Ainda em 2010, o mesmo grupo de pesquisadores verificou, por um método de fracionamento nuclear, que o EGFR é translocado para a membrana nuclear interna (INM) do envelope nuclear (EN) após estímulo por EGF, num processo dependente de importina β e de interação com o complexo do poro nuclear (NPC). Por uma série de experimentos envolvendo imunoprecipitação, fracionamento nuclear e imunomicroscopia eletrônica, foi observado que o EGFR se localiza na INM com Sec61 β , uma das proteínas que compõem o translocon Sec61. Além disso, o estudo indica que a Sec61 β tem papel no transporte do EGFR da INM para o nucleoplasma, uma vez que sua depleção inibe essa translocação. Os autores sugerem um novo modelo, exposto na figura 2B, no qual a translocação de EGFR ocorre por uma via de transporte integral do ER para o envelope nuclear (*integral trafficking from the ER to the nuclear envelope transport – INTERNET*) (WANG et al., 2010b; WANG et al., 2012), o que difere do modelo anterior de Liao e colaboradores.

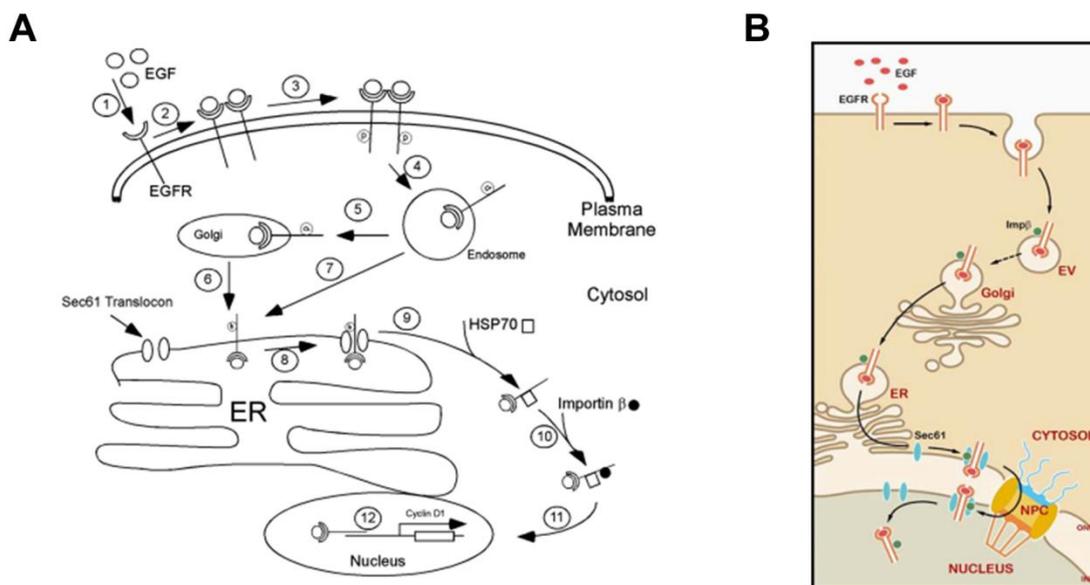


Figura 2: Modelos de translocação de EGFR para o núcleo. Os dois modelos sugerem que o receptor é endocitado após ativação por ligante e os endossomos são direcionados ao complexo de Golgi e desse para o retículo endoplasmático via transporte retrógrado. **A-** Translocação de EGFR para o núcleo segundo Liao e colaboradores. No Retículo endoplasmático, o EGFR é retrotranslocado para o citosol pelo complexo Sec61. No citosol, o receptor se associa às proteínas Hsp70 e Importina β , que medeia sua passagem através do complexo do poro nuclear para o nucleoplasma (fonte: LIAO; CARPENTER, 2007). **B-** Translocação de EGFR para o núcleo de acordo com Wang e colaboradores. Do retículo endoplasmático o receptor se desloca para a membrana nuclear interna pela via de endomembranas denominada *INTERNET*. Da membrana nuclear interna, o EGFR é, então, translocado para o nucleoplasma por associação a Sec61 β (fonte: WANG et al., 2010b).

Para avaliar os processos iniciais da translocação de EGFR para o núcleo, Campos e colaboradores, em 2011, verificaram a translocação de EGF conjugado a Alexa Fluor® 488 por microscopia confocal em tempo real, e observaram que ela tem pico aos 10 minutos e que o ligante utilizado se colocaliza com seu receptor. Esse tráfego é dependente de dinamina e clatrina, já que a expressão de uma forma dominante negativa de dinamina e a depleção de clatrina por pequenos RNAs de interferência (siRNA) levam ao acúmulo de EGFR na membrana plasmática da célula (CAMPOS et al., 2011).

Complementando a via de translocação de EGFR para o núcleo, em outro estudo do grupo do Hung e colaboradores, foi investigada a via de translocação de EGFR para o complexo de Golgi. Observou-se que ela é dependente de syntaxina 6, uma proteína SNARE que regula tráfego endossomal para o Golgi e que interage diretamente com EGFR. Além disso, microtúbulos e dineína são requeridos para a translocação desse receptor para Golgi, o que sugere que vesículas endocíticas contendo EGFR sejam transportadas via microtúbulos por associação com dineína. Por fim, verificaram que syntaxina, dineína e microtúbulos são importantes para a detecção de EGFR no núcleo (DU et al., 2013).

Apesar de vários aspectos da translocação de EGFR para o núcleo terem sido estudados, é necessário verificar outras moléculas que participam da ativação e regulação dessa via, bem como os mecanismos pelos quais isso ocorre. A importância da translocação em tipos celulares diferentes, a localização subnuclear dos receptores translocados e a função desempenhada por eles no núcleo são tópicos ainda pouco investigados.

1.4 - EGFR e Câncer

Desde a década de 1970 a associação do EGFR e seus ligantes a processos oncogênicos têm sido estudada. Scher e Todaro verificaram que células derivadas de alguns tumores sólidos humanos eram capazes de proliferar em meio sem fatores de crescimento, o que não ocorria para fibroblastos e células epiteliais não tumorais (SCHER; TODARO, 1971). Essas células tumorais seriam capazes de secretar fatores de crescimento de forma autócrina, assim como células infectadas por alguns tipos de vírus (SPORN; TODARO, 1980). Mais tarde, com o sequenciamento do EGFR, foi confirmada a alta homologia entre as regiões transmembrana e citoplasmática desse receptor e a proteína oncogênica v-erbB, indicando que essa proteína seria originada da incorporação dessas regiões do EGFR aviário pelo vírus da eritroblastose aviária. Foi verificado também que o EGFR de células tumorais A431, além de superexpresso,

possuía variantes não encontradas nas células de tecido placentário (ULLRICH et al., 1984). Na mesma época, um estudo mostrou que células de carcinoma escamoso de pulmão e de cabeça e pescoço humanos apresentavam expressão de EGFR 2,5 a 5 vezes maior do que células epiteliais normais (HENDLER; OZANNE, 1984). Outros estudos reportaram a superexpressão de EGFR em tumores primários de cérebro de origem não neuronal (LIBERMANN et al., 1984) e a presença de variantes do receptor em tumores primários de origem glial (LIBERMANN et al., 1985).

Atualmente já se sabe que alterações como amplificação gênica, deleções, superexpressão e mutações no domínio tirosina cinase dos receptores ERBB estão associadas a neoplasias, como câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), de mama, de cólon, de ovário e glioblastoma. Devido a essa relação, terapias contra o câncer que têm esses receptores como alvo têm sido desenvolvidas (ROSKOSKI, 2014; YARDEN; PINES, 2012). Essas terapias, em geral, apresentam menos efeitos colaterais do que os quimioterápicos citotóxicos de amplo espectro (ROSKOSKI, 2014) e são mais eficazes quando utilizadas em combinação a esses tratamentos e à radioterapia (NYATI et al., 2006).

Na década de 80 foi visto que anticorpos monoclonais produzidos em camundongos que inibem a capacidade de ligação do EGF ao EGFR bloqueavam a fosforilação desse receptor e a proliferação de fibroblastos induzida pelo ligante (revisado por YARDEN; PINES, 2012). Com base em estudos que mostravam a capacidade de inibição do crescimento de tumores por esses anticorpos, foi gerado um anticorpo quimérico capaz de inibir a proliferação de células tumorais, conhecido como cetuximab (Erbix; Bristol-Myers Squibb). Esse foi aprovado pela *Food and Drugs Administration* (FDA), inicialmente, para tratamento de câncer colorretal metastático em combinação à quimioterapia e, posteriormente, para tratamento de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, em conjunto a outros quimioterápicos ou à radioterapia. (PENG et al., 1996; YARDEN; PINES, 2012). O anticorpo humano anti-EGFR panitumumab (Vectibix; Amgen) também foi aprovado pela FDA para tratamento de pacientes com câncer colorretal como terapia única de segunda linha. Ambos o cetuximab e o panitumumab se ligam com alta afinidade ao EGFR e inibem sua ativação por ligante (ROSKOSKI, 2014).

Outra classe de drogas aprovadas para terapias anticâncer foram os inibidores de tirosina cinase (TKI), moléculas derivadas da quinazolina que inibem a autofosforilação do EGFR (ROSKOSKI, 2014). O gefitinib (Iressa; AstraZeneca) foi aprovado pela FDA, em 2003, para tratamento de segunda linha de NSCLC, mas foi visto que sua eficácia estava associada a mutações associadas ao gênero, à etnia e a pacientes não fumantes (LYNCH et al., 2004; PAEZ et al., 2004; PAO et al., 2004). O

erlotinib (Tarceva; Roche/Genentech) também foi aprovado para tratamento de segunda linha de pacientes com NSCLC por ter sido visto aumento da sobrevivência de pacientes que usaram esse TKI (COHEN et al., 2005). O erlotinib é, ainda, utilizado como tratamento de primeira linha de pacientes com NSCLC que apresentam deleções no éxon 19 ou mutação L858R no éxon 21 de EGFR e de pacientes com câncer de pâncreas, em conjunto com gemcitabina (ROSKOSKI, 2014). O afatinib (Gilotrif; Boehringer Ingelheim), diferentemente do gefitinib e do erlotinib, é um inibidor irreversível do EGFR e foi aprovado em 2013 pela FDA para tratamento de primeira linha de pacientes com NSCLC que apresentam deleções no éxon 19 ou mutação L858R no éxon 21 de EGFR (ROSKOSKI, 2014). O Lapatinib (Tykerb; GlaxoSmithKline) é um inibidor reversível da fosforilação de EGFR e de ERBB2, com inibição subsequente da fosforilação de Akt (XIA et al., 2002), e tem sido usado para tratamento de segunda linha de tipos de câncer de mama que expressam ERBB2 (ROSKOSKI, 2014).

A resistência às terapias que têm como alvo o EGFR é um dos problemas enfrentados por pacientes oncológicos. Em relação à resistência aos anticorpos anti-EGFR, foi observado que ela está associada a mutações no gene KRAS (DI FIORE et al., 2007). Resistência secundária ao tratamento está relacionada a mutações que inibem a ligação do cetuximab ao receptor, como a S492R (no ectodomínio de EGFR) (MONTAGUT et al., 2012), ou ao aumento da expressão de ERBB2 (YONESAKA et al., 2011). Para os inibidores de tirosina cinase gefitinib e erlotinib, a mutação T790M no EGFR (secundária à terapia), a qual altera a associação desses inibidores ao receptor, é responsável por resistência em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (PAO et al., 2005). Além disso, a ativação da via PI3K por aumento da expressão do receptor do fator de crescimento hepático desencadeia resistência ao gefitinib (ENGELMAN et al., 2007). Todos esses mecanismos mostram que a resistência a terapias anti-EGFR, em geral, ocorre por modificações secundárias do receptor ou por desenvolvimento de vias alternativas para a sinalização do receptor (YARDEN; PINES, 2012). Inibidores irreversíveis de tirosina cinase de terceira geração desenvolvidos têm apresentado eficiência na inibição da mutação T790M (HAN; DU, 2017). Em adição a isso, novas drogas e novas formas de tratamento com a combinação de terapias alvo específicas entre elas ou com quimioterapia e radioterapia estão em fase de estudo clínico ("*Clinical Trials*").

A presença de EGFR no núcleo foi relacionada a diversos tipos de tumores (PEREIRA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016; LO; HSU; HUNG, 2006), e o EGFR nuclear também tem sido associado à resistência de pacientes a tratamentos radioterápicos e quimioterápicos, o que apresenta relevância clínica (LEE; WANG;

HUNG, 2015). Resistência ao cetuximab pode estar relacionada a uma interação entre EGFR nuclear e proteínas kinases Src (IIDA et al., 2013a), e terapias que degradam o EGFR são promissoras para o tratamento de pacientes resistentes a essa droga (IIDA et al., 2013b). O EGFR nuclear também está associado a resistência ao gefitinib, uma vez que, após a fosforilação do receptor por Akt, este ativa BCRP, um cassete transportador ligado a ATP que leva ao efluxo do gefitinib intracelular (HUANG et al., 2011; CHEN et al., 2011). Outro mecanismo de resistência a terapias anticâncer ocorre pela fosforilação da ATM por EGFR nuclear. Essa proteína cinase serina/treonina participa da resposta a danos de quebra dupla do DNA, após estímulo por radiação ionizante, o que promove o reparo do DNA e a resistência à radioterapia (LEE et al., 2015). Além de ser fator de resistência a tratamentos, a presença do EGFR no núcleo tem sido associada a pior prognóstico em diversos tipos de neoplasias, como câncer de mama (LO et al., 2005b; HADZISEJDIĆ et al., 2010), de ovário (XIA et al., 2009), esofágico (HOSHINO et al., 2007), de bexiga (LI et al., 2012), de orofaringe (PSYRRI et al., 2005) e câncer de pulmão de células não pequenas (TRAYNOR et al., 2013).

A inibição do processo de translocação de EGFR para o núcleo pode ser alvo de terapias combinadas para impedir a resistência de pacientes a tratamentos associada a essa via (HAN; LO, 2012). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos de resistência envolvidos na presença de EGFR no núcleo e sobre os alvos que poderiam ser utilizados para inibir essa translocação. Além disso, a localização subnuclear do EGFR pode estar associada a outras funções do receptor ainda desconhecidas, e que podem ter importância patológica.

1.5 - Envelope nuclear e Retículo Nucleoplasmático

Mais do que limitar a região nuclear, separando-a do citoplasma, o envelope nuclear (EN) constitui um microambiente especializado no núcleo, apresentando funções na regulação da transcrição gênica, na organização da cromatina, no transporte de moléculas entre núcleo e citoplasma e na plasticidade, migração e vias de sinalização celulares (WILSON; BERK, 2010).

O EN é formado pelas membranas nucleares interna (INM) e externa (ONM), que são interligadas por complexos do poro nuclear, os quais participam do transporte núcleo-citoplasmático de moléculas. Entre as membranas está o espaço perinuclear, que é contínuo ao lúmen do retículo endoplasmático (PRUNUSKE; ULLMAN, 2006). Abaixo da INM está a lâmina nuclear, uma rede composta por proteínas do filamento intermediário denominadas lâminas do tipo A (lâmina A e lâmina C, formadas por

splicing alternativo de um único gene) e lâminas do tipo B (lâmina B1 e lâmina B2, cada uma codificada por um gene) (DECHAT et al., 2010). A rede complexa de interações entre proteínas da ONM, da INM, do NPC e da lâmina, bem como a associação dessas proteínas com componentes do esqueleto celular (citoesqueleto e nucleoesqueleto) e com a cromatina são fundamentais para a rigidez e integridade do envelope nuclear e para as diversas funções que ele desempenha na célula (CHOW; FACTOR; ULLMAN, 2012).

A ONM do envelope nuclear é contínua à membrana do retículo endoplasmático, o que permite a difusão lateral de proteínas integrais pela membrana (PRUNUSKE; ULLMAN, 2006). Além de estar associado a uma organela citoplasmática, o EN apresenta continuidade com uma organela nuclear, que pode apresentar funções desempenhadas por ele em locais mais internos do nucleoplasma. Essa organela é denominada retículo nucleoplasmático (RN).

O RN é formado por invaginações de uma ou ambas as membranas do envelope nuclear para o nucleoplasma (figura 3). Bourgeois e colaboradores, em 1979, revisaram a associação dessas invaginações ao nucléolo em diversos tipos celulares, e sugeriram o nome de “canais nucleolares” devido a essa característica (BOURGEOIS; HEMON; BOUTEILLE, 1979). Mais tarde, o nome retículo nucleoplasmático foi sugerido devido à similaridade dessa organela com o retículo endoplasmático quanto à estrutura e à capacidade de estocar e liberar Ca^{2+} (ECHEVARRÍA et al., 2003).

Em relação à estrutura, há dois tipos de RN, determinados de acordo com observações feitas por microscopia eletrônica de transmissão. O tipo I é caracterizado por invaginação apenas da INM, com cerne composto por espaço perinuclear, que contém marcadores do retículo endoplasmático como dissulfeto isomerase, calreticulina e oligossacarídeos N-ligados à manose. O RN tipo I pode ser desprovido de proteínas do complexo do poro nuclear e de LAP2 β , uma proteína da INM. A lâmina pode ser vista revestindo essas invaginações, mas estão geralmente ausentes. Já o RN tipo II constitui-se de invaginações da INM e ONM, apresentando NPC e cerne citoplasmático com presença de elementos do citoesqueleto, ribossomos, mitocôndrias e pequenas vesículas. Essas invaginações podem transpassar todo o núcleo e são revestidas por lâmina íntegra. Ambos os tipos de RN podem ocorrer na mesma célula, sendo possível, inclusive, ocorrer invaginação do tipo I a partir de uma do tipo II (MALHAS; GOULBOURNE; VAUX, 2011). A representação esquemática dos dois tipos de RN é mostrada na figura 3.

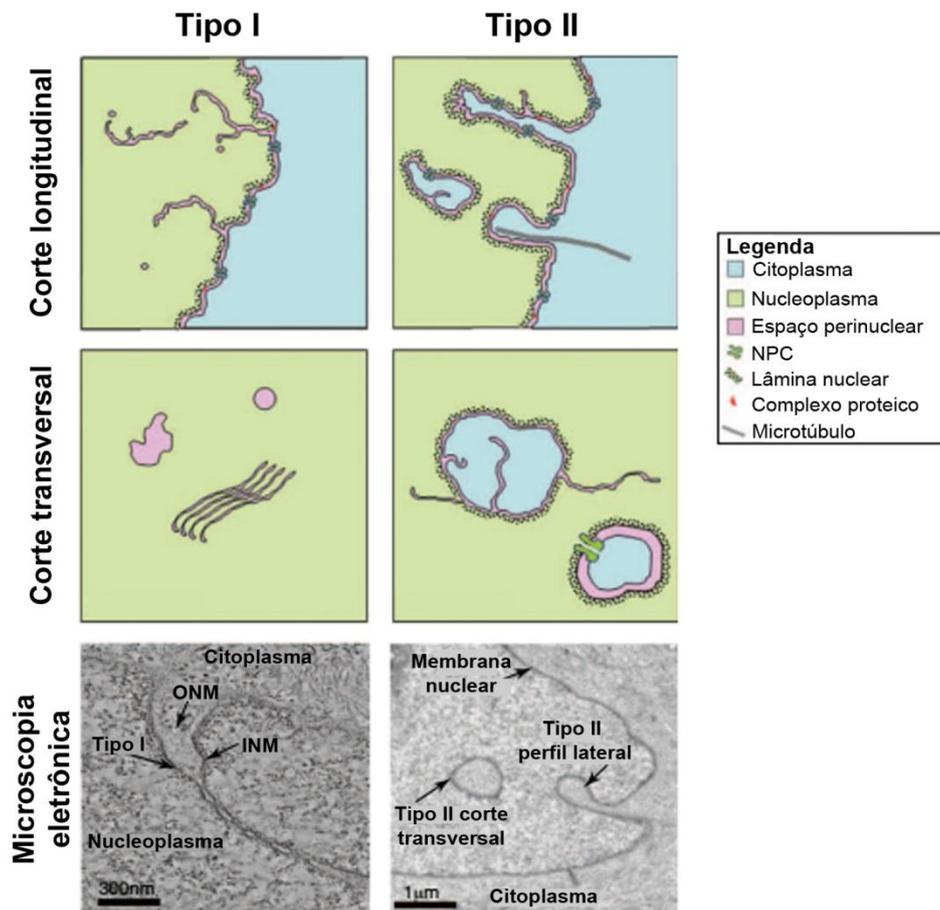


Figura 3: Representação do retículo nucleoplasmático tipos I e II (adaptado de MALHAS; GOULBOURNE; VAUX, 2011). Esquemas representativos do perfil longitudinal (imagem superior) e transversal (imagem do meio) das invaginações do envelope nuclear do tipo I (à esquerda) e do tipo II (à direita). A legenda define os compartimentos e estruturas representados nessas figuras. Imagens de microscopia eletrônica (parte inferior) apresentando cada um dos tipos de retículo nucleoplasmático. ONM: membrana nuclear externa; INM: membrana nuclear interna.

A formação do RN pode estar associada ao rearranjo nuclear após a mitose, mas também é observada em células interfásicas. Em um estudo com núcleos politênicos de *Drosophila melanogaster*, foi proposto um modelo no qual as forças mecânicas exercidas pela condensação da cromatina atuam sobre a face nuclear do envelope nuclear associado a ela, levando à formação das invaginações do RN (BOZLER et al., 2015). Alternativamente, o citoesqueleto, que também está associado à estrutura do EN, pode exercer força sobre a face citoplasmática deste, culminando na invaginação das membranas nucleares. Outra hipótese é a de que o RN é formado *de novo* por maquinarias envolvidas na deformação de membranas lipídicas, como ocorre na regulação da curvatura das membranas do retículo endoplasmático pelos reticulons (DROZDZ; VAUX, 2016). Além disso, foi visto que alteração da expressão e modificações nos componentes do envelope nuclear, como lâmina A, podem aumentar a quantidade de invaginações do RN (BOZLER et al., 2015; DROZDZ; VAUX, 2016).

O RN foi identificado em células de invertebrados, plantas e mamíferos, em condições normais e também patológicas (MALHAS; GOULBOURNE; VAUX, 2011). A quantidade de invaginações presentes na células pode estar relacionada ao seu estado de diferenciação, e células cancerosas desdiferenciadas apresentam uma maior quantidade de invaginações (JOHNSON et al., 2003).

A associação entre o RN, marcado por lâminas tipo A, e outras estruturas nucleares foi verificada por Legartová e colaboradores. Foi observado que o RN está associado a regiões do nucléolo ricas em fibrilarina ou em UBF-1, onde ocorre transcrição ativa de genes ribossomais. Além disso, foi verificada associação das lâminas invaginadas com a proteína da heterocromatina HP1 β , refletindo na formação de heterocromatina similar à que ocorre na periferia nuclear (LEGARTOVÁ et al., 2014). Essas observações sugerem que o RN pode estar envolvido no transporte de moléculas associadas a organelas nucleares, na ativação da transcrição gênica e no remodelamento da cromatina. A presença de complexos do poro nuclear nessas invaginações sugere que ela também possa estar envolvida no transporte núcleo-citoplasmático de moléculas, e a presença de actina em seu cerne poderia estar associada a uma mecanotransdução de sinal do citoplasma para o nucleoplasma (FRICKER et al., 1997).

Evidências sugerem que o RN seja responsável pelo estoque e pela liberação de cálcio nuclear, uma vez que esse possui receptor de Ins(1,4,5)P3 e receptores de rianodina, ambos envolvidos na liberação de cálcio estocado no ER (ECHEVARRÍA et al., 2003; BOOTMAN et al., 2009). Além disso, Echevarria e colaboradores observaram que o sinal de cálcio induzido por liberação experimental de Ins(1,4,5)P3 no núcleo inicia-se próximo ao RN (ECHEVARRÍA et al., 2003).

Alterações na morfologia do envelope nuclear estão frequentemente presentes em células cancerosas e apresentam significância prognóstica (DEY, 2010). A identificação dessas irregularidades tem permitido maior acurácia em exames diagnósticos (SCHIRMER; DE LAS HERAS, 2014). Além disso, mudanças na expressão, no processamento, nas interações e na estrutura de componentes do EN estão relacionadas a um fenótipo tumoral, uma vez que eles estão associados à migração e divisão celulares, à estabilidade cromossômica, à expressão gênica e ao controle da sinalização intracelular, processos alterados no câncer (CHOW; FACTOR; ULLMAN, 2012). Como o retículo nucleoplasmático é contínuo ao EN, sua frequência e estrutura no núcleo celular podem estar associadas a processos oncogênicos relacionados a deformações do envelope nuclear, o que o torna, inclusive, um potencial biomarcador tumoral (SCHIRMER; DE LAS HERAS, 2014).

1.6 – Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (hASC)

As células-tronco são capazes de se autorrenovar e de se diferenciar em diversos tecidos. Por terem capacidade de diferenciação em células derivadas dos três folhetos embrionários (pluripotência) e proliferação ilimitada (THOMSON et al., 1998), as células-tronco embrionárias são visadas para uso no âmbito científico. Porém, aspectos éticos envolvidos na utilização dessas células são um entrave para seu estudo. Devido a isso, fontes de células-tronco em tecidos adultos foram estudadas na tentativa de obtenção de células imunocompatíveis cujo uso não seria impedido por esses princípios éticos. Nesse contexto, as células-tronco mesenquimais (MSC) derivadas de medula óssea, identificadas pela primeira vez por Friedenstein e colaboradores (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008) e apresentando capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais (PITTINGER et al., 1999), foram tidas como promissoras para uso na engenharia de tecidos. No entanto, a quantidade dessas células obtidas durante a extração é pequena e o procedimento para essa obtenção é doloroso (SHAMBLOTT et al., 1998; ZUK, 2013).

As células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC) foram identificadas pela primeira vez por Zuk e colaboradores em 2001. Denominadas, primeiramente, como células de lipoaspirado processado (PLA), elas foram derivadas de populações aderentes da fração vascular estromal de lipoaspirado. Essas células possuem morfologia fibroblastóide e são capazes de se diferenciar em linhagens adipogênica, osteogênica, condrogênica e miogênica, assim como as MSC (ZUK et al., 2001). Em 2002, Zuk e colaboradores realizaram a caracterização bioquímica e molecular da população de células PLA e de clones isolados dessas, denominados células-tronco derivadas de tecido adiposo. Nesse estudo, foi confirmado o perfil tronco-mesenquimal das células derivadas do tecido adiposo (ZUK et al., 2002). Desde esses trabalhos pioneiros, as hASC têm sido amplamente utilizadas em pesquisas com células-tronco e em medicina regenerativa. Caracterizações subsequentes do perfil de expressão de marcadores e do potencial de diferenciação em outras linhagens e tecidos (inclusive os de origem ectodérmica e endodérmica) foram realizadas (ZUK, 2013).

Para uniformizar a definição de MSC, a Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs um critério em 2006. Foi recomendada a denominação “células estromais mesenquimais multipotentes” e foi definido que elas: são aderentes a plástico em cultura; expressam CD105, CD73 e CD90 e não apresentam os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA classe II; são capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*

(DOMINICI et al., 2006). Em 2013, foi proposta uma adaptação desse critério para melhor caracterização de células-tronco derivadas de tecido adiposo. O novo critério sugere que essas células devem apresentar no mínimo dois marcadores negativos, dentre os quais CD45, CD31, CD235a (com expressão menor que 2%) e CD11b (expressão negativa ou baixa) e dois marcadores positivos, dentre os quais CD13, CD29, CD73, CD90, CD44 e CD105 (com expressão maior que 80%) (BOURIN et al., 2013).

1.7 - Células SK-HEP-1

A linhagem celular SK-HEP-1 foi estabelecida a partir de células retiradas do líquido ascítico de um paciente do sexo masculino com adenocarcinoma hepático. Essa linhagem foi descrita morfológicamente pela primeira vez em 1975, por Fogh e Trempe, como células originadas de carcinoma hepatocelular (HEFFELFINGER et al., 1992), mas estudos posteriores verificaram que as células SK-HEP-1 não expressam produtos proteicos específicos do fígado (TURNER; TURNER, 1980) e que anticorpos monoclonais produzidos contra essa linhagem não reagem com o fígado (CARLSON et al., 1985).

Em 1992, Heffelfinger e colaboradores fizeram uma nova caracterização das células SK-HEP-1. Eles verificaram que essas células não expressam fibrinogênio alfa e gama e albumina, proteínas específicas do fígado. Ao cultivarem clones de SK-HEP-1 em placas de microtitulação, foram observadas três morfologias mais evidentes: células pouco aderentes que crescem sobre células vizinhas aderidas, feixes de células fusiformes e células individuais epitelóides. Análises de imunohistoquímica sugeriram uma origem mesenquimal e características endoteliais para essas células, o que foi endossado pela capacidade de formação de estruturas tubulares similares a capilares em matrigel e em gel de colágeno tipo I (HEFFELFINGER et al., 1992).

Apesar de ter sido caracterizada como célula endotelial de características mesenquimais, Eun e colaboradores, em 2014, verificaram que as SK-HEP-1 não expressavam CD31, marcador típico de células endoteliais de origem mesenquimal. Para investigar, então, as características mesenquimais desse tipo celular, os autores verificaram a expressão de marcadores de superfície característicos de algumas linhagens. A expressão de marcadores de linhagem hepática, mioblastóide, mioepitelial, hematopoiética e endotelial (CD34, CD31, CD144, E-selecina, CD106/ICAM-1) não foi detectada para as SK-HEP-1. No entanto, foi observado que o perfil de expressão de CD73, CD44, CD90, CD105, CD166, α -SMA, marcadores de células-tronco mesenquimais, não diferiu entre as SK-HEP-1 e células-tronco

mesenquimais derivadas de tecido adiposo ou de medula óssea (EUN et al., 2014). A capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica das SK-HEP-1 e a expressão de genes característicos dessas linhagens por essas células também foram observadas por Eun e colaboradores, confirmando o perfil de MSC dessas células tumorais (EUN et al., 2014).

Na análise do potencial tumorigênico, foi observado que as SK-HEP-1 possuem alta capacidade de formação de tumor e de metástase. A injeção subcutânea de 10 células em camundongos imunodeficientes NOD/SCID/IL2rg foi capaz de gerar tumores metastáticos em 96% dos casos, e a injeção de apenas uma célula gerou tumores metastáticos em 10 de 28 camundongos injetados (EUN et al., 2014). Células isoladas dos tumores produzidos foram novamente cultivadas e apresentavam morfologia característica das SK-HEP-1 e perfil de expressão de marcadores de superfície similares às células parentais. Além disso, quando as células isoladas dos tumores gerados foram injetadas em camundongos imunodeficientes, ocorreu a formação de tumores metastáticos de forma similar à anterior (EUN et al., 2014).

Devido à alta capacidade tumorigênica e metastática das SK-HEP-1 e ao seu perfil de célula-tronco mesenquimal, Eun e colaboradores sugeriram que essa linhagem seria de células-tronco tumorais (CSC), composta por MSC transformadas oncogenicamente com alta capacidade de autorrenovação e proliferação e com alto potencial tumorigênico e metastático. Além disso, o estudo foi o primeiro a mostrar evidências de que MSC podem se transformar em CSC e que células provenientes de tumores gerados por essas apresentam o mesmo perfil e capacidade tumorigênica da célula parental (EUN et al., 2014).

2. JUSTIFICATIVA

A translocação de EGFR para o núcleo tem importante papel para a biologia da célula, uma vez que as funções do EGFR nuclear estão associadas à proliferação, ao reparo de DNA, à resistência a drogas e à radiação, à inflamação e à tumorigênese. Há dois modelos principais que propõem um mecanismo de translocação do receptor. Um deles estabelece que o EGFR é retrotranslocado do retículo endoplasmático para o citoplasma e deste passa pelo complexo do poro nuclear para o nucleoplasma. O outro propõe que o EGFR é translocado por uma via de endomembranas da superfície celular para a membrana interna do envelope nuclear, da qual é extraído para o nucleoplasma. Ambas as hipóteses foram bem fundamentadas, e ainda não se sabe qual delas estaria correta ou se ambas poderiam ocorrer em contextos ou tipos celulares diferentes.

Apesar de alguns componentes da via de translocação terem sido desvendados, pouco se sabe sobre sua cinética em diferentes tipos celulares e sobre a participação de componentes nucleares nessa translocação. Como uma organela associada ao envelope nuclear por ser constituída pela invaginação de suas membranas para o núcleo, o retículo nucleoplasmático poderia participar do transporte de EGFR associado à via de endomembranas. Além disso, por alcançar regiões profundas do nucleoplasma, o retículo nucleoplasmático poderia estar envolvido no direcionamento do receptor para compartimentos específicos do núcleo, como o nucléolo, que está associado a ele. A localização subnuclear do EGFR não foi determinada, e pode estar associada a outras possíveis funções desse receptor no núcleo celular.

Dada a importância do EGFR nuclear em diversos tipos de câncer, tanto como fator de pior prognóstico quanto como mecanismo de resistência de pacientes a terapias, investigar processos associados ao transporte desse receptor para o núcleo e a sua localização subnuclear se faz necessário. A comparação desses processos entre células tumorais e células não tumorais seria relevante para desvendar aspectos específicos da biologia do receptor em contexto normal e patológico.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Estudar a cinética de translocação do fator de crescimento epidermal (EGF) para o núcleo e a sua localização subnuclear em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (hASC) e em células mesenquimais tumorais (SK-HEP-1).

3.2 - Objetivos Específicos

- Estudar o perfil mesenquimal das células SK-HEP-1 e hASC;
- Verificar a capacidade de diferenciação de ambos os tipos celulares em linhagens osteogênica e adipogênica;
- Analisar a cinética de translocação de EGF para o núcleo nos dois tipos celulares por microscopia de superresolução;
- Quantificar a expressão total de EGFR em ambos os tipos celulares;
- Estudar a colocalização entre EGF e seu receptor (EGFR) nos dois tipos celulares por microscopia de superresolução;
- Analisar a presença e a estrutura do retículo nucleoplasmático em ambos os tipos celulares por microscopia eletrônica de transmissão e por microscopia de superresolução;
- Observar a localização subnuclear específica do EGF translocado nos dois tipos celulares.

4. MÉTODOS

4.1 - Obtenção das células

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (hASC) foram retiradas de 11 pacientes submetidos a lipoaspiração ou abdominoplastia na clínica STK- Núcleo de Cirurgia Plástica (Belo Horizonte, MG) no período do estudo (dois anos), conforme aprovado por comitê de ética em pesquisa (COEP: 55698116.2.0000.5149). O tecido adiposo foi lavado em tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS: 0,138 M de NaCl; 0,010 M de fosfato e 0,0027 M de KCl) por duas vezes e submetido a digestão por 0,1 % de colagenase do tipo 1 (Sigma-Aldrich) a 37 °C por 45 a 60 minutos. A cada 15 minutos a solução foi vigorosamente agitada de forma manual até que o tecido estivesse bem digerido. Em seguida, ela foi centrifugada a 300 x g por 10 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspendido em meio completo (composição detalhada na seção 4.2). As células foram transferidas para garrafa de cultura de 25 cm² (T25; Sarstedt) e mantidas em estufa com atmosfera úmida a 37 °C e 5 % de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias até que a garrafa atingisse uma confluência aproximada de 80 % e as células pudessem ser transferidas para garrafas de cultura de 75 cm² (T75; Sarstedt) para subcultura.

As células humanas SK-HEP-1 (ATCC® HTB52) foram obtidas da *American Type Culture Collection* e congeladas em tanque de nitrogênio líquido conforme especificação do fornecedor.

4.2 - Cultivo das células

As células foram cultivadas em meio completo, composto por meio modificado de Dulbecco com alta glicose (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose*; DMEM; Sigma-Aldrich), com 4,5 g/L de glicose e 4 mM de L-glutamina, suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio (VETEC), 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e com solução de antibióticos e antimicótico com concentração final no meio de: 100 U/mL de Penicilina; 0,1 mg/mL de Estreptomicina e 0,25 µg/mL de Anfotericina B (PSA; Sigma-Aldrich). Esse meio teve o pH ajustado para 7.2 e foi filtrado em membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm (Millipore).

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Sarstedt) e colocadas em estufa com atmosfera úmida a 37 °C e 5 % de CO₂. A troca de meio ocorreu a cada 3 dias e a subcultura foi realizada quando a confluência da garrafa atingiu de 80 % a 90

% ou a cada 3 dias. Para a subcultura, as células foram tratadas com 0,05 % tripsina-EDTA (Gibco) por 4 a 6 minutos a 37 °C. As hASC foram utilizadas nas passagens de 3 a 5 e as células SK-HEP-1 foram utilizadas nas passagens de 5 a 30.

4.3 - Caracterização imunofenotípica das células

A expressão de marcadores de superfície de células mesenquimais foi avaliada por citometria de fluxo (Guava[®] easyCyte 6-2L – Millipore) para as células SK-HEP-1 e hASC. Após tratamento com 0,05 % tripsina-EDTA (Gibco), as células foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos e incubadas com solução de bloqueio, contendo 1 % de albumina de soro bovina (BSA) (Sigma) e 5 % de soro de cabra (Gibco) em PBS. As células foram novamente centrifugadas e o precipitado foi ressuspenso em solução contendo anticorpo monoclonal de camundongo na diluição 1:50 para cada um dos clusters de diferenciação (CD): CD105, CD90, CD45 (BD[®] Bioscience) e CD11b (Immuno Tools). O grupo controle foi incubado apenas em PBS com 1 % de BSA (Sigma). Após incubação por 30 minutos a 4 °C, as células foram centrifugadas e ressuspenso em solução de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo Alexa Fluor[®] 488 (Life Technologies) ou Alexa Fluor[®] 647 (Life Technologies) na diluição de 1:500. Após incubação por 30 minutos a 25 °C, as células foram lavadas com PBS e diluídas para leitura no citômetro.

Os parâmetros tamanho e granulosidade foram ajustados para o grupo controle e a definição da população de células que seriam analisadas foi feita após leitura de 5000 eventos pelo citômetro. O ajuste da intensidade de fluorescência para o Alexa Fluor[®] 488 (filtro de emissão 525/30) ou para o Alexa Fluor[®] 647 (filtro de emissão 661/19), em escala logarítmica, também foi realizado para o grupo controle, para delimitar a faixa de ausência de marcação. Definidos os parâmetros, iniciou-se a leitura dos eventos em triplicata para cada um dos marcadores utilizados. Em células-tronco mesenquimais, a marcação para CD105 e CD90 deve ser maior que 80 %, enquanto para CD45 deve ser menor que 2 % e para CD11b deve ser baixa (BOURIN et al., 2013). A porcentagem média de eventos positivos para cada um deles foi determinada de acordo com o grupo controle não marcado por análise dos diagramas de dispersão de pontos obtidos pelo citômetro e foi representada por histogramas. As análises foram feitas com o uso do software FlowJo[™].

4.4 - Diferenciação das células em linhagem osteogênica

Para a diferenciação de ambos os tipos celulares em linhagem osteogênica, foram semeadas 1×10^4 células por poço (hASC) ou 1 a 5×10^3 células por poço (SK-HEP-1) em placas de 6 poços (Sarstedt). Após 12 a 24 horas, o meio completo foi substituído por meio de diferenciação osteogênica em pH 7,2 a 25 °C, composto por: DMEM (Sigma-Aldrich), 1 % de PSA, 10 % de SFB (Gibco), 50 μ M de ácido ascórbico (Ecibra), 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich) e 0,1 μ M de dexametasona (Aché) (ZUK et al., 2001). Para os poços controles, o meio foi substituído por meio completo novo. A troca de meio se deu a cada 2 dias, durante 21 dias.

No 21º dia, iniciou-se o protocolo de coloração de Von Kossa para as células dos poços experimentais e controles, como descrito a seguir. As células foram lavadas com PBS e fixadas com etanol (Neon) a 70 % por 24 horas a 4 °C. Depois de lavadas com água destilada, foi adicionada solução de nitrato de prata (Cromoline) a 5 % em água em todos os poços, que foram, então, expostos a luz ultravioleta por 1 hora. As células foram lavadas com água destilada, incubadas em solução de 5 % de tiosulfato de sódio (Cinética Química LTDA) em água destilada por 5 minutos e foram novamente lavadas. Em seguida, elas foram contra-coradas com eosina por 40 segundos e analisadas ao microscópio Olympus IX70 para verificar a produção de matriz de mineralização característica de células da linhagem osteogênica. A fotodocumentação foi realizada nos aumentos de 4 x, 10 x e 20 x, com o uso da câmera QIClick e do software Image Pro Plus 7.01 (Media Cybernetics).

4.5 - Diferenciação das células em linhagem adipogênica

Para diferenciação em linhagem adipogênica, células foram semeadas na concentração de 1×10^4 células por poço (hASC) ou 1 a 5×10^3 células por poço (SK-HEP-1) em placas de 6 poços (Sarstedt). Após 12 a 24 horas, o meio completo foi substituído por meio de diferenciação adipogênica em pH 7,2 a 25 °C, composto por: DMEM (Sigma-Aldrich), 1 % de PSA, 10 % de SFB (Gibco), 0,1 μ M de dexametasona (Aché), 50 μ M de Indometacina (Sigma-Aldrich), 100 UI de insulina (Lilly) e 0,5 mM de isobutil-metilxantina (Sigma-Aldrich) (ZUK et al., 2001). Nos poços controles o meio foi substituído por meio completo novo. O meio dos poços experimentais e controles foi trocado a cada 2 dias.

No 21º dia de experimentação, as células foram lavadas com PBS e fixadas por solução de formaldeído (Cromoline) a 10 % em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavadas com água destilada, as células foram incubadas em solução

de isopropanol (Neon) a 60 % em água destilada por 5 minutos e, em seguida, incubadas em solução de óleo vermelho O (Sigma-Aldrich) por 5 minutos adicionais. Os poços foram lavados com água destilada e contra-corados com hematoxilina (Doles) por 1 minuto. As células foram analisadas ao microscópio invertido Olympus IX70 para verificar a presença de gotículas lipídicas intracelulares coradas com o óleo vermelho O. A fotodocumentação foi realizada nos aumentos de 4 x, 10 x e 20 x, com o uso da câmera QIClick (QImaging) e do software Image Pro Plus 7.01 (Media Cybernetics).

4.6 – Imunofluorescência

Para realizar o protocolo de marcação de proteínas celulares por imunofluorescência, lamínulas de 22 mm x 22 mm (Electron Microscopy Sciences) foram flambadas e colocadas em cada um dos poços de placas de 6 poços (Sarsted). Em seguida, foram semeadas 2×10^5 células em 2 mL de meio completo sobre as lamínulas. No dia seguinte, o meio completo foi retirado dos poços e esses foram lavados com PBS previamente à adição de meio sem SFB. Após 16 h, as células foram estimuladas com EGF biotilado complexado a Alexa Fluor[®] 488 estreptavidina (EGF-488) (Life Technologies) a 200 mg/mL pelos tempos de 0 (sem estímulo), 5, 10, 20 e 40 minutos, para a análise da cinética de translocação de EGF para o núcleo e da sua localização subnuclear, e por 10 e 40 minutos para as análises de colocalização entre EGF e seu receptor (EGFR). Em seguida, elas foram lavadas com PBS, fixadas com solução de formaldeído (Cromoline) a 3,7 % em PBS por 15 minutos, lavadas novamente com PBS e permeabilizadas por solução de triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 0,05 % em PBS por 15 minutos. As células foram novamente lavadas com PBS e incubadas por 1 hora em solução do bloqueio contendo 1 % de BSA (Sigma-Aldrich) e 5 % de soro de cabra (Gibco) em PBS. As lamínulas foram, então, incubadas a 4 °C por 12 a 16 horas em solução de anticorpo primário, diluído em PBS com 1 % de BSA (Sigma-Aldrich) conforme apresentado na tabela 1. Após lavar as lamínulas com PBS por 3 vezes de 5 minutos, elas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente em solução de anticorpo secundário (produzido em cabra) diluído em PBS com 1 % de BSA (Sigma-Aldrich) (tabela 1). A essa solução também foi adicionada a sonda nuclear Hoechst 33258 (Life Technologies) na concentração de 1 µg/mL. As lamínulas foram lavadas com PBS por 3 vezes de 10 minutos e montadas em lâmina utilizando-se o meio de montagem Prolong Gold Antifade Reagent (Molecular Probes).

Tabela 1: Anticorpos utilizados para imunofluorescência

Experimento	Marcação	Anticorpo primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
Cinética de translocação de EGF para o núcleo e localização subnuclear do EGF	Nucléolo	Monoclonal de coelho anti-fibrilarina (Cell Signalling)	1:400	Alexa Fluor® 555 de cabra anti-coelho (Invitrogen)	1:1000
	Envelope Nuclear	Monoclonal de camundongo anti-Lâmina B2 (Life Technologies)	1:100	Alexa Fluor® 647 de cabra anti-camundongo (Invitrogen)	1:1000
Colocalização entre EGF e EGFR	EGFR	Monoclonal de camundongo anti-EGFR (Millipore)	1:250	Alexa Fluor® 555 de cabra anti-camundongo (Invitrogen)	1:1000

Para cada experimento de imunofluorescência, foram montadas lâminas experimentais, com todas as marcações desejadas, e lâminas controles, com a marcação por apenas um anticorpo primário e incubação com todos os anticorpos secundários utilizados nas lâminas experimentais. Dessa forma, é possível estabelecer a marcação de fundo (*background*) de cada anticorpo secundário para a molécula ou estrutura marcada por cada anticorpo primário. O controle negativo do experimento foi realizado com a marcação apenas por anticorpos secundários e sonda Hoechst.

4.7 - Microscopia de superresolução

As lâminas com células marcadas por imunofluorescência foram analisadas por microscopia de superresolução, utilizando-se o microscópio Zeiss LSM 880 com detector de Airyscan e o software ZEN2, no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) da UFMG. Para a aquisição de imagens foi utilizada a objetiva plana-apocromática com aumento de 63 vezes, abertura numérica (NA) de 1.4, tendo óleo como meio de imersão. Os lasers utilizados foram: Diodo 405 nm (para excitação de Hoechst), Argônio 458/488/514 nm (para excitação de Alexa Fluor® 488), HeNe 543 nm (para excitação de Alexa Fluor® 555) e HeNe 633 nm (para excitação de Alexa Fluor® 647). O detector utilizado foi o Airyscan, composto por 32 elementos que simulam, cada um, uma íris (*pinhole*) de 0,2 unidade de Airy (UA), possibilitando a obtenção de imagens com maior resolução nas três dimensões (X, Y e Z) em comparação à microscopia confocal convencional. As dimensões das imagens adquiridas foram de 1024 pixels x 1024 pixels, 16-bits.

Para cada lâmina experimental, foram realizadas séries de seções ópticas no eixo Z (série Z) de, pelo menos, 4 campos. As séries Z foram feitas de modo a abranger todo o volume celular para obtenção de imagens em 3 dimensões. Foram adquiridas séries Z de todos os canais também para as lâminas controles. Todas as imagens foram processadas pelo Airyscan antes de serem analisadas, e a

fluorescência dos pixels para cada canal após esse processamento tinha intensidade similar, de acordo com o perfil traçado pelo software ZEN2.

4.8 - Quantificação dos clusters de EGF

Células estimuladas com EGF-488 por 0 (sem estímulo) 5, 10, 20 e 40 minutos e com marcação para nucléolo, envelope nuclear e núcleo (conforme detalhado na seção 4.6) foram analisadas por microscopia de superresolução. Foram adquiridas imagens em série Z de, pelo menos, 4 campos por tempo de estímulo para cada experimento de imunofluorescência, sendo 2 experimentos para cada tipo celular. O ajuste do ganho e da intensidade de laser para o canal de EGF na aquisição das imagens foi o mesmo entre os diferentes tempos de estímulo para cada tipo celular, de forma a permitir uma análise quantitativa dos clusters de EGF marcados. Foram adquiridas imagens de campo claro de todos os campos para verificar a morfologia e integridade das células e, assim, selecioná-las para a análise da cinética de translocação de EGF para o núcleo.

Para a análise das células, foi delimitado o contorno nuclear de cada uma delas e a área nuclear foi selecionada, gerando outro arquivo apenas com o núcleo de uma célula. Essa imagem foi aberta no software Image Pro Plus Premier 3D (Media Cybernetics). Por meio da função “*Iso surface*”, uma superfície renderizada em 3 dimensões para as marcações de EGF-488 e de núcleo foi criada. Essa superfície é baseada na fluorescência do canal selecionado, sendo possível ajustá-la para eliminar o *background* de marcação e selecionar apenas o objeto desejado. A imagem tridimensional gerada foi comparada à imagem de superresolução original para verificar se os objetos tridimensionais gerados pelo software condiziam com as marcações das estruturas fluorescentes desejadas. Essa comparação foi realizada em imagens de núcleos de células estimuladas com EGF-488 por 40 minutos. A partir dessa análise, foi determinada a área do histograma de distribuição da intensidade de marcação dos pixels que seria considerada pelo programa para gerar a superfície em 3 dimensões para o canal 488. Essa área foi delimitada de forma a excluir os pixels com baixa intensidade de marcação pelo EGF-488, e foi determinado, para cada imagem, um limite inferior de intensidade de fluorescência que o software deveria considerar ao gerar o objeto tridimensional. Foi estabelecida a média do valor desse limiar para cada experimento e para cada tipo celular. O limiar inferior médio de intensidade de fluorescência do canal de EGF-488 determinado para as células estimuladas por 40 minutos foi utilizado para gerar as imagens tridimensionais de todas as células de um mesmo experimento e de um mesmo tipo.

Os dados quantitativos da superfície tridimensional criada para o canal EGF-488, como o número de objetos marcados por esse canal na imagem e o volume desses, foram gerados pelo software. As estruturas marcadas por EGF-488 foram denominadas *clusters*, ou aglomerados, de EGF. Os dados obtidos foram utilizados para a análise do número de *clusters* de EGF por núcleo, do volume médio de cada cluster e do volume total ocupado pelos *clusters* em cada núcleo (número de *clusters* X volume médio de cada *cluster*), para as hASC e para as SK-HEP-1, em cada tempo de estímulo. As análises foram feitas considerando-se apenas as células que continham *clusters* de EGF no núcleo. Os parâmetros foram comparados entre os tempos em cada tipo celular.

4.9 - Análises de colocalização

A colocalização entre EGF e EGFR foi verificada em células hASC e SK-HEP-1 estimuladas por 10 e 40 minutos com EGF-488 e marcadas para anticorpo anti-EGFR, conforme detalhado na seção 4.6. Imagens em série Z de 5 campos por tempo de estímulo foram adquiridas por microscopia de superresolução. Para as análises de colocalização, foi utilizado o software ZEN *lite Black edition* e o protocolo descrito em “*Colocalization analysis in AIM and ZEN - A Carl Zeiss how-to guide*”. Cada pixel da imagem foi plotado em um diagrama de dispersão de acordo com a intensidade de marcação para cada um dos canais a serem analisados, conforme exemplificado na figura 4A (à esquerda). No quadrante número 1 estão os pixels com intensidade de fluorescência alta para um canal, e no quadrante 2 estão os pixels com intensidade de fluorescência alta para o outro canal. No quadrante 3 estão os pixels com alta intensidade de fluorescência para ambos os canais, ou seja, os pixels em que ocorre a colocalização entre os dois canais. Já no quadrante 4, os pixels têm intensidade de fluorescência baixa para ambos os canais, ou seja, correspondem ao *background* de marcação.

Para determinar a posição das linhas horizontal e vertical que definem cada um dos quadrantes (campo destacado pelo retângulo vermelho na figura 4A), foram utilizadas as imagens das lâminas controles com apenas uma das marcações (EGF ou EGFR), mas com ambos os canais Alexa Fluor[®] 488 e Alexa Fluor[®] 555 adquiridos. Como exemplificado na figura 4B, as linhas vertical e horizontal foram posicionadas de forma que todos os pixels ficassem abaixo delas, e nenhum no quadrante de colocalização (quadrante 3). O valor de intensidade de fluorescência no qual cada linha seria posicionada foi obtido pela média de 3 imagens bidimensionais controles, originadas a partir da junção das seções ópticas da série z com projeção de máxima

intensidade dos pixels. Esses valores foram utilizados para a análise de colocalização das imagens experimentais, que contém ambas as marcações (exemplificada pela figura 4A, à direita) e que também foram obtidas pela projeção de máxima intensidade das seções ópticas da série Z adquirida.

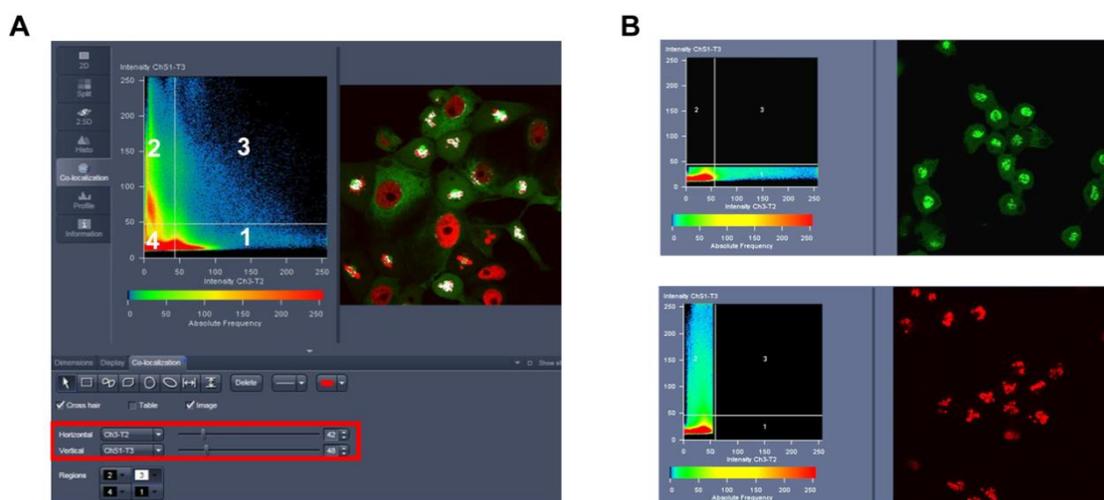


Figura 4: Exemplo da análise de colocalização realizada pelo software ZEN lite Black edition. A - À esquerda, diagrama de dispersão de pixels de uma imagem experimental com duas marcações. Os quadrantes 1, 2, 3 e 4 estão representados no gráfico. Pixels que apresentam marcação de ambos os canais (verde e vermelho) estão representados no quadrante 3 e como pontos brancos na imagem à direita da figura. As linhas horizontais e verticais que definem os quadrantes do diagrama de dispersão são ajustadas no campo marcado por retângulo vermelho. B- Imagens controles com apenas uma das marcações desejadas (verde ou vermelha). A posição das linhas verticais e horizontais são determinadas de forma que todos os pixels estejam localizados abaixo delas. As imagens foram retiradas do manual “Colocalization analysis in AIM and ZEN - A Carl Zeiss how-to guide”.

O coeficiente de correlação de Pearson foi gerado para cada imagem pelo software ZEN lite Black edition. Valores positivos indicam correlação linear positiva entre as duas variáveis (intensidade de fluorescência de cada canal); valores negativos indicam correlação linear negativa, e valor zero indica ausência de correlação. Quanto mais próximo de 1, maior a correlação positiva entre os canais.

4.10 - Extração de proteínas totais

Para extrair proteínas totais de cada tipo celular, foram semeadas 2×10^5 células por poço em placas de 6 poços (Sarstedt), em meio completo. Quando os poços atingiram confluência de 70 a 100 %, o meio completo foi substituído por meio sem SFB. Após 12 a 16 h, as células foram lavadas com PBS por duas vezes e foram lisadas por tampão NETN, composto por 150 mM de cloreto de sódio (VETEC), 1 mM de EDTA (Sigma-Aldrich), 20 mM de Tris-HCl pH 8,0 (Sigma-Aldrich) e 0,5 % de

Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich), e suplementado com 1 % de coquetel de inibidores de protease e de coquetéis de inibidores de fosfatase. As células foram coletadas em tubos de centrifugação de 1,5 mL, agitadas por 1 minuto em vórtex, sonicadas por 1 minuto e incubadas em gelo por 10 minutos. Os tubos foram, então, centrifugados a 16000 x g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado em novos tubos, que foram congelados a -20 °C. Para as células SK-HEP-1 foram extraídas proteínas de células de 3 culturas diferentes. Para as hASC, foram extraídas proteínas de células em quinta passagem de um paciente e de células em quarta e em quinta passagem de outro paciente.

As proteínas extraídas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Primeiramente foi estabelecida uma curva padrão a partir de soluções com concentrações conhecidas e crescentes de BSA (Sigma-Aldrich) incubadas com o reagente de Bradford e colocadas em leitor de placas para medição da absorbância a 595 nm. A partir da curva, a concentração de proteínas das amostras foi determinada após incubação dessas com o reagente de Bradford e medição da absorbância a 595 nm.

4.11 - Western Blot

Amostras contendo 30 µg de proteína, tampão de amostra e Ditiotreitól (DTT, Sigma-Aldrich) como agente desnaturante foram aplicadas em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) a 10 %. Também foi aplicado o padrão de peso molecular *Plus Protein™* ou *Kaleidoscope™* (Bio-Rad) para que fosse possível verificar a localização da proteína com o tamanho de interesse. As proteínas foram separadas por eletroforese a 90 V por 90 minutos e, em seguida, foram transferidas do gel para membrana de fluoreto de polivinilideno com o uso do sistema de transferência semi seco (Trans-Blot Semi-Dry Cell – Bio-Rad) a 20 V por 90 minutos. As membranas foram, então, incubadas por uma hora em solução de bloqueio, composta por 5 % de leite em pó desnatado em TBST, solução salina tamponada com Tris (20 mM de NaCl, 20 mM de Tris base a pH 8,0) com 0,05 % de Tween® 20 (Sigma-Aldrich).

Após bloqueio, as membranas foram incubadas em anticorpo primário diluído em solução de bloqueio por 12 a 24 h a 4 °C. Os anticorpos primários utilizados foram anti- α tubulina monoclonal feito em camundongo (Sigma-Aldrich) na diluição 1:1000 e anti-EGFR policlonal produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:250. Após lavar as membranas por 3 vezes de 5 minutos em TBST, elas foram incubadas por uma hora em solução de bloqueio com anticorpo secundário anti-coelho (diluição 1:2000) (Cell Signaling) e anti-camundongo (diluição 1:1000) (Life

Techonologies) conjugados a peroxidase. As membranas foram novamente lavadas em TBST por 3 vezes de 10 minutos e foram incubadas por 5 minutos em solução ECL Plus (Thermo Scientific). A peroxidase do anticorpo secundário reage com um substrato presente nessa solução, ativando a oxidação do luminol (que também constitui o ECL) e produzindo luz. Os filmes BioMax[®] MR (Carestream/Kodak) foram expostos às membranas e foram revelados e fixados para verificar a expressão das proteínas de interesse (EGFR e α -tubulina) em amostras dos dois tipos celulares. As análises quantitativas foram realizadas nas imagens digitalizadas com o uso do software Image J.

4.12 - Microscopia Eletrônica de Transmissão

As células SK-HEP-1 e hASC foram processadas para análise da ultraestrutura nuclear por microscopia eletrônica de transmissão. Para tal, elas foram semeadas em placas de 60 mm de diâmetro na concentração de 5×10^5 (hASC) e 6×10^5 (SK-HEP-1) em meio completo. Após 48 h, com uma confluência de 90 a 100 % das placas, o meio foi substituído por fixador Karnovsky modificado, composto por 2,5 % de glutaraldeído (EMS), 2 % de paraformaldeído (MERCK) e 0,1 M de tampão fosfato (0,1 M de fosfato de sódio monobásico e 0,1 M de fosfato de sódio dibásico) pH 7,3. As células permaneceram incubadas em fixador por um mínimo de 2 h e foram, então, removidas mecanicamente das placas com a utilização de um raspador de células (*cell scraper*). Após coletadas, elas foram centrifugadas a $300 \times g$ por 5 minutos e o precipitado foi lavado com tampão fosfato a 0,1 M pH 7,3. As amostras foram mantidas em tampão fosfato 0,1 M e encaminhadas ao Centro de Microscopia da UFMG para continuidade do processamento.

No Centro de Microscopia da UFMG, após nova centrifugação, o precipitado foi embebido em agarose (Synth) a 2 % e mantido por duas horas em fixador secundário, composto por 2 % de tetróxido de ósmio (EMS), 1,5 % de ferrocianeto (Synth) e tampão fosfato a 0,1 M. As amostras foram lavadas com água destilada e contrastadas em solução de 2 % de acetato de uranila (EMS) em solução aquosa com 13,3 % de sacarose (MERCK) por 24 horas. Após lavadas com água destilada, as amostras foram desidratadas por incubação em soluções com concentração crescente (v/v) de etanol em série (35 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 % e 100 %) e foram incubadas em soluções com proporções crescentes de Epon (EMS):acetona (MERCK) para o processo de infiltração em resina. As amostras foram, então, incluídas em resina pura e colocadas em estufa a 45 °C e 60 °C para obtenção de blocos de resina com as amostras nas extremidades.

Foram realizados cortes de 300 nm de espessura (cortes semi-finos) das amostras com uso de navalha de vidro em ultramicrotomo (Leica, modelo UC6) para verificar a região com maior concentração de células para análise. As amostras foram, então, submetidas a ultramicrotomia para a realização dos cortes ultra-finos de 60 nm de espessura, com o uso de navalha de diamante no ultramicrotomo. Esses cortes foram dispostos em telas de cobre de 200 *meshes* e foram contrastados em solução filtrada de citrato de chumbo (MERCK). As telas com as amostras foram analisadas ao microscópio Tecnai G2-12 SpiritBiotwin FEI 120kV, no Centro de Microscopia da UFMG, para aquisição de imagens ultraestruturais das células nos aumentos de 9900x, 16500 x e 43000 x.

4.13 - Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados pelo programa GraphPad Prism 7.0. As amostras foram representadas graficamente por média \pm erro padrão. Em relação à cinética de translocação, as células que não possuíam *clusters* de EGF no núcleo não foram utilizadas nas análises. Para as hASC, os dados referentes ao número de *clusters* de EGF no núcleo, ao volume médio dos *clusters* e ao volume total ocupado por eles no núcleo para células estimuladas foram normalizados em relação às células não estimuladas (0 minutos), uma vez que foi detectada marcação de *clusters* inespecífica pelo método de quantificação estabelecido na seção 4.8. Essa normalização se deu pela divisão de cada valor pela média do parâmetro em análise para as células não estimuladas. As análises foram feitas considerando os valores obtidos para as células não estimuladas, mas esse grupo não foi representado graficamente. Para as SK-HEP-1 não houve *background* de marcação para as células não estimuladas, então esse grupo não foi considerado nas análises. A normalidade dos dados foi verificada pelos testes de D'Agostino & Pearson. A distribuição normal dos dados foi assumida para amostras que passaram no teste de normalidade ($\alpha=0,05$) ou que possuíam n maior que 30. Nesses casos, foram aplicados testes paramétricos, como teste T de Student, ($\alpha=0,05$). Para as demais amostras foram aplicados testes não paramétricos, como teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

5. RESULTADOS

5.1 - Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (hASC) e células da linhagem SK-HEP-1 expressam marcadores característicos de células-tronco mesenquimais (MSC).

As células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hASC) de pacientes saudáveis submetidos a lipoaspiração ou abdominoplastia apresentam capacidade de aderência em plástico e possuem aspecto morfológico homogêneo do tipo fibroblástico. Já as células SK-HEP-1 apresentam maior heterogeneidade de formas em cultura, com algumas células aderentes de morfologia epitelial ou endotelial e outras células pouco aderentes e arredondadas (figura 5).

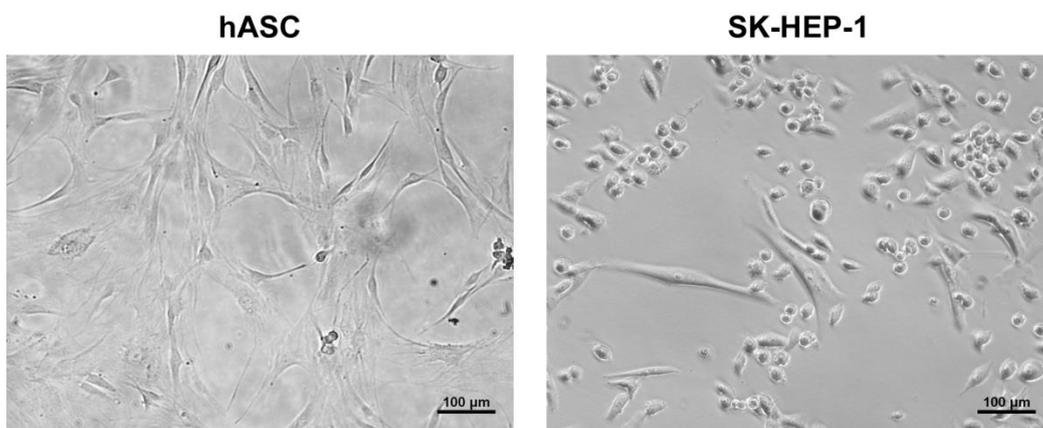


Figura 5: Modelos celulares. Imagens de contraste de fase das células utilizadas no presente estudo. As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (hASC) possuem aspecto homogêneo fibroblástico e as células tumorais da linhagem SK-HEP-1 apresentam populações heterogêneas. Aumento: 20 x; barra de escala: 100 µm.

A caracterização dos dois tipos celulares como células-tronco mesenquimais (MSC) foi realizada por citometria de fluxo (figura 6). O perfil de marcação dos anticorpos foi comparado entre as células marcadas com anticorpo primário para os *clusters* de diferenciação CD105, CD90, CD11b ou CD45 e as células não marcadas (controle negativo). Para as hASC, a imunofenotipagem apresentou marcação positiva (maior que 80 %) para CD 105 e para CD 90 e marcação negativa (menor que 2 %) para CD11b e para CD45, como característico para MSC (tabela 2). Esses resultados sugerem, portanto, que as células isoladas de tecido adiposo apresentam um perfil tronco-mesenquimal.

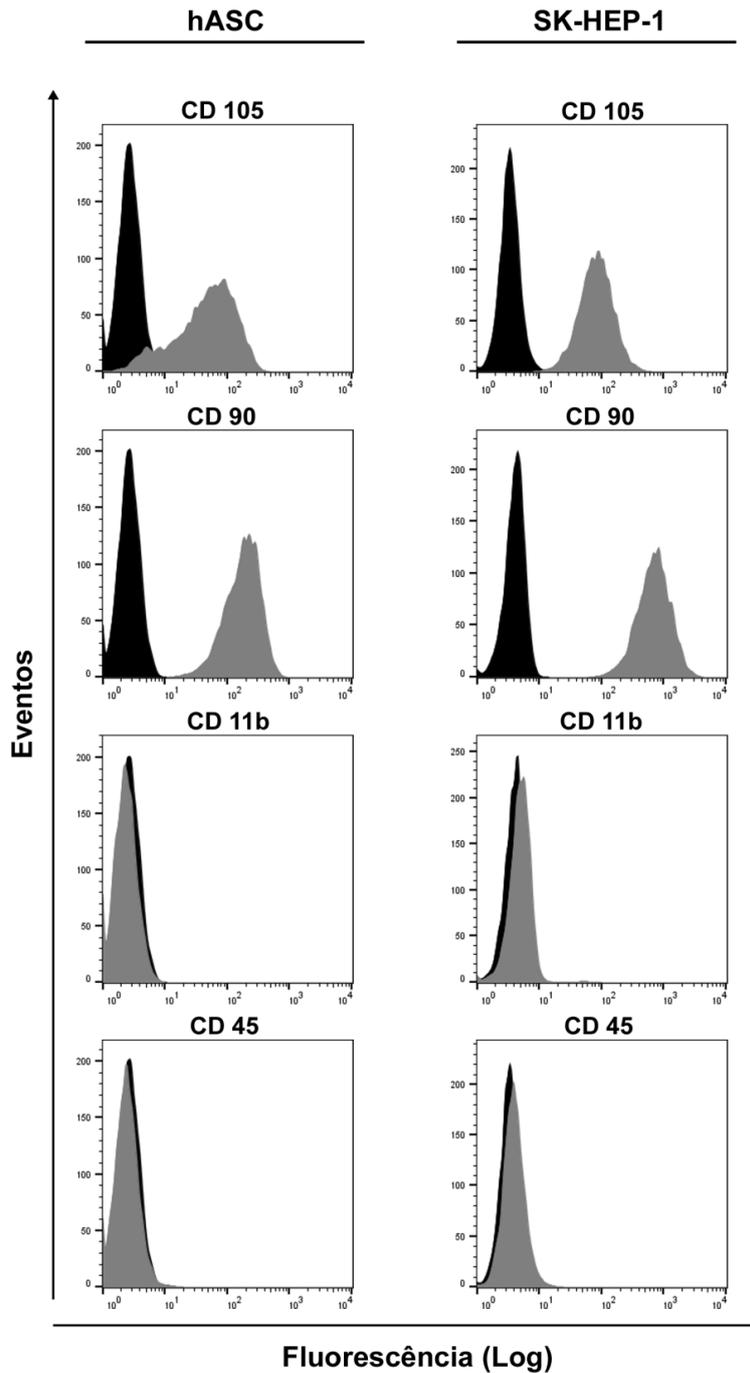


Figura 6: hASC e SK-HEP-1 expressam marcadores de superfície característicos de células-tronco mesenquimais. As células foram imunofenotipadas por citometria de fluxo quanto ao perfil tronco-mesenquimal. Histogramas representam o número de eventos (eixo Y) em relação à intensidade de fluorescência da marcação do anticorpo secundário utilizado (eixo X). Em cinza, histogramas dos eventos marcados com os anticorpos para os *clusters* de diferenciação indicados (CD 105, CD 90, CD 11b, CD 45). Em preto, histogramas do controle negativo de marcação. Por análise dos diagramas de dispersão de pontos, foi estabelecida a porcentagem de eventos positivos em relação ao controle negativo para hASC e SK-HEP-1. Dados representativos de um experimento, com leitura em triplicata de 5000 eventos para cada marcação.

Tabela 2: Expressão de marcadores de superfície pelas hASC

	Marcadores de superfície			
	Estromais		Hematopoiéticos	
	CD105	CD90	CD11b	CD45
Percentual médio de marcação (%)	90,30	99,83	0,55	1,93
Erro padrão (%)	0,21	0,07	0,07	0,07

As células SK-HEP-1 apresentaram marcação de 5,52 % \pm 0,03 % para CD45, marcador de células hematopoiéticas. A imunofenotipagem dessas células apresentou o perfil característico de MSC para as marcações positivas de CD105 e CD90 e para a marcação baixa de CD11b (tabela 3). Esses resultados sugerem que as SK-HEP-1 expressam marcadores característicos de células estromais mesenquimais, apesar de apresentarem uma baixa expressão de CD45.

Tabela 3: Expressão de marcadores de superfície pelas células SK-HEP-1

	Marcadores de superfície			
	Estromais		Hematopoiéticos	
	CD105	CD90	CD11b	CD45
Percentual médio de marcação (%)	99,80	99,97	4,44	5,52
Erro padrão (%)	0,06	0,03	0,18	0,03

5.2 - hASC e SK-HEP-1 apresentam capacidade de diferenciação em linhagens mesenquimais

A capacidade de diferenciação das hASC e SK-HEP-1 foi verificada por meio do cultivo em meio indutor de adipogênese ou osteogênese por 21 dias, seguido de coloração diferencial. A figura 7 mostra, em diferentes aumentos, a capacidade de diferenciação osteogênica para hASC e SK-HEP-1, com a formação de matriz de mineralização por essas células. Na coloração de Von Kossa, os depósitos de cálcio da matriz são reduzidos pela luz UV e substituídos pela prata, o que confere a esses depósitos a cor amarronzada, como mostrado nas imagens de células cultivadas em meio osteogênico (figura 7).

A diferenciação adipogênica das hASC foi evidenciada pela presença de gotículas lipídicas coradas com Óleo Vermelho O no interior das células cultivadas em meio adipogênico, como mostrado em diferentes aumentos na figura 8. Nas células SK-HEP-1 é possível verificar a presença de estruturas intracelulares marcadas com

esse corante. Porém, elas não são exclusivas de células cultivadas em meio adipogênico, estando presentes também nas células controles, cultivadas em meio completo (figura 8).

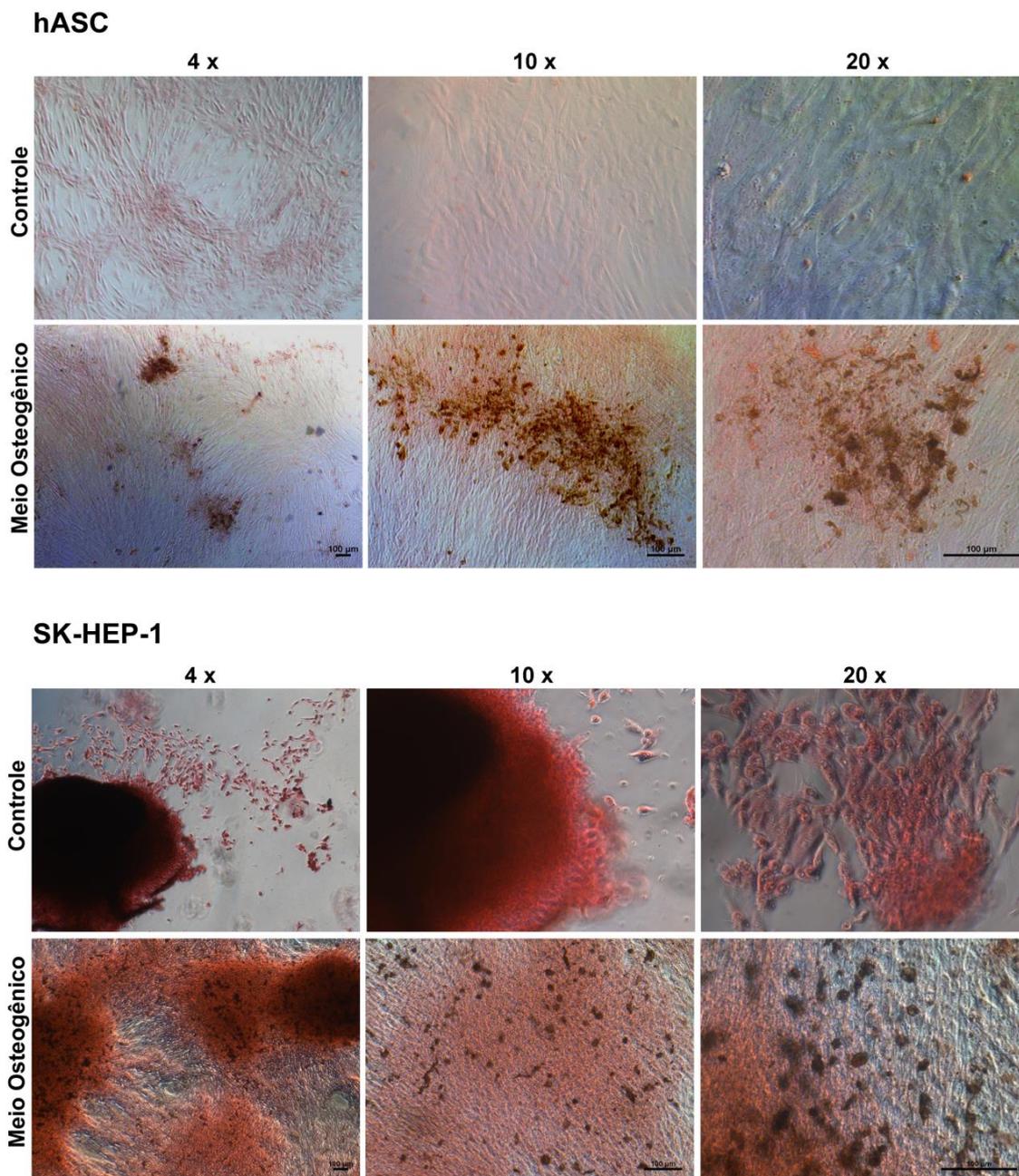


Figura 7: hASC e SK-HEP-1 possuem capacidade de diferenciação osteogênica. Células foram cultivadas em meio completo (controle) e meio osteogênico por 21 dias e foram submetidas à coloração de Von Kossa. Imagens de contraste de fase nos três aumentos (4 x, 10 x e 20 x) mostram a presença de matrizes de mineralização (em marrom) produzidas por células hASC e SK-HEP-1 diferenciadas em linhagem osteogênica. Barra de escala: 100 µm; n=3.

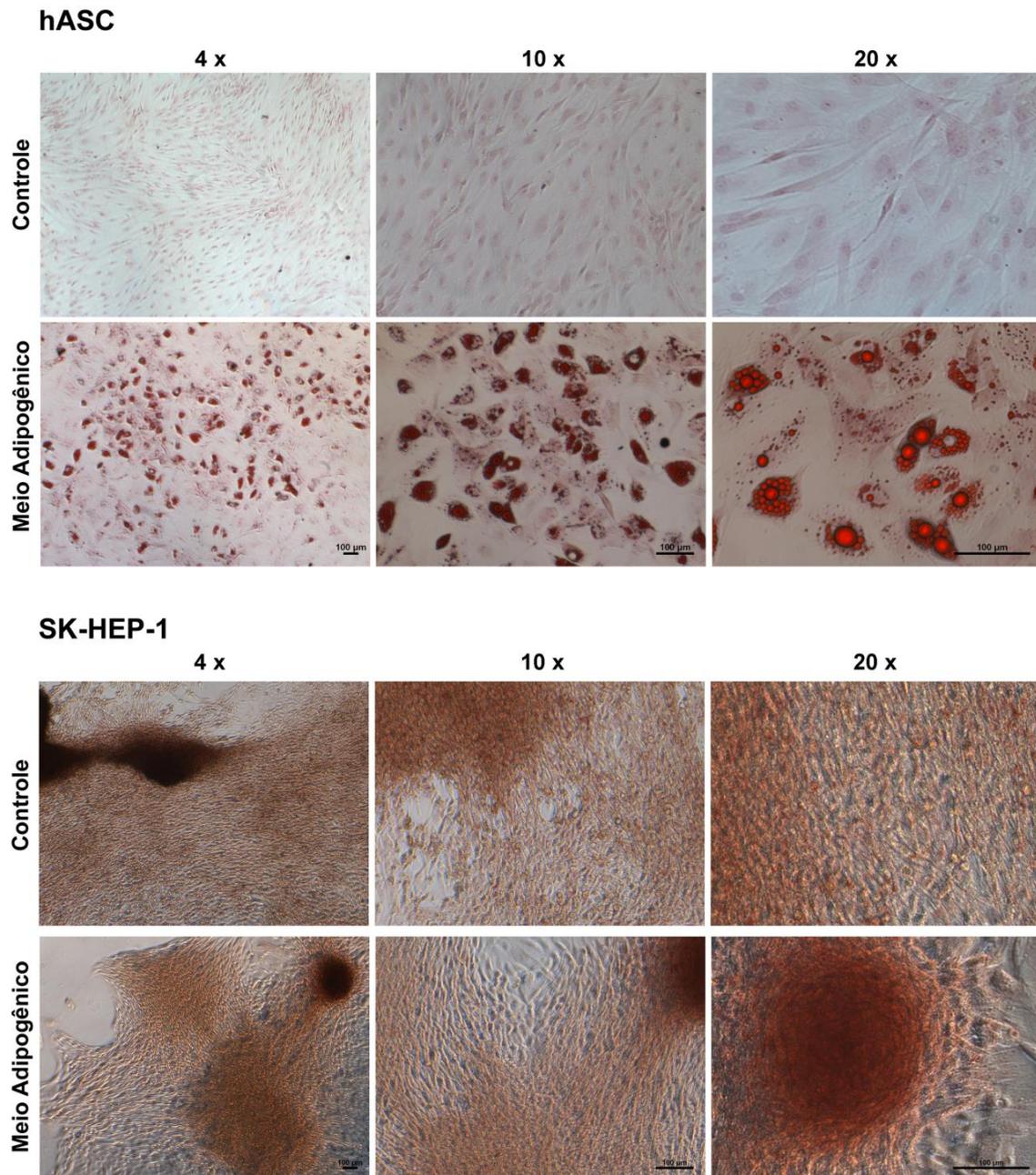


Figura 8: Capacidade de diferenciação em linhagem adipogênica é verificada em hASC, mas não em SK-HEP-1. Células foram cultivadas em meio completo (controle) e meio adipogênico por 21 dias e foram submetidas à coloração de óleo vermelho O. Imagens de contraste de fase mostram a presença de gotículas lipídicas intracelulares (em vermelho) em hASC (meio adipogênico) nos três aumentos (4 x, 10 x e 20x). Para as SK-HEP-1, não houve diferença de coloração entre células controles e células cultivadas em meio adipogênico. Barra de escala: 100 µm; n=3.

Esses resultados mostram que ambos os tipos celulares se diferenciam em linhagem osteogênica, mas a capacidade de diferenciação em linhagem adipogênica foi confirmada apenas para as hASC por esse método.

5.3 - A translocação do fator de crescimento epidermal (EGF) para o núcleo ocorre em hASC e em SK-HEP-1

Para verificar se a translocação de EGF para o núcleo ocorre em ambos os modelos celulares, células foram estimuladas por 0 (sem estímulo), 5, 10, 20 e 40 minutos com EGF biotilado complexado a Alexa Fluor® 488 estreptavidina (EGF-488) e tiveram o núcleo marcado por sonda Hoechst. Na figura 9A é possível verificar que, com 5 minutos de estímulo, poucos *clusters* (conjuntos) de EGF (em verde) podem ser vistos no núcleo (em azul) de hASC e de células SK-HEP-1. Com o aumento do tempo de permanência de EGF no meio, os *clusters* aumentam em número e em volume na região nuclear. Para as hASC, o volume dos *clusters* parece maior com 40 minutos de estímulo. Para as SK-HEP-1, os *clusters* aparentam ter maior volume com 20 e 40 minutos de estímulo, tempos nos quais parece ocorrer uma maior quantidade de *clusters* nesse tipo celular em comparação às hASC (figura 9A). As imagens da reconstrução tridimensional das seções ópticas em série do núcleo celular, adquiridas por microscopia de superresolução, confirmam a presença dos *clusters* de EGF no nucleoplasma em hASC e em SK-HEP-1 (figura 9B).

Na figura 9C estão representadas imagens de campo claro de ambos os tipos celulares. As setas apontam exemplos de células selecionadas para a análise quantitativa da translocação de EGF para o núcleo. As células que apresentaram morfologia e integridade anormais, ou que estavam superpostas por outras células, não foram consideradas para quantificação dos *clusters* de EGF no núcleo.

5.4 - A cinética de translocação de EGF para o núcleo difere entre hASC e SK-HEP-1

A análise quantitativa da cinética de translocação de EGF para o núcleo em hASC e em SK-HEP-1 foi feita com o uso do software Image Pro Plus Premier 3D, como detalhado na seção 4.8 - Quantificação dos *clusters* de EGF. A figura 10 apresenta imagens da superfície renderizada tridimensional para o núcleo e para os *clusters* de EGF gerada pelo programa para cada tempo de estímulo com EGF-488 e para cada tipo celular. Pelas imagens é possível observar que, tanto para hASC (figura 10A) quanto para SK-HEP-1 (figura 10B), os *clusters* de EGF (em verde) aumentam em quantidade no nucleoplasma (em azul) a partir de 10 minutos de estímulo, apresentando um volume maior em tempos posteriores. Os *clusters* tridimensionais foram definidos a partir da determinação de um limite inferior de intensidade de

fluorescência dos pixels para o canal do Alexa Fluor® 488, fluoróforo conjugado ao EGF.

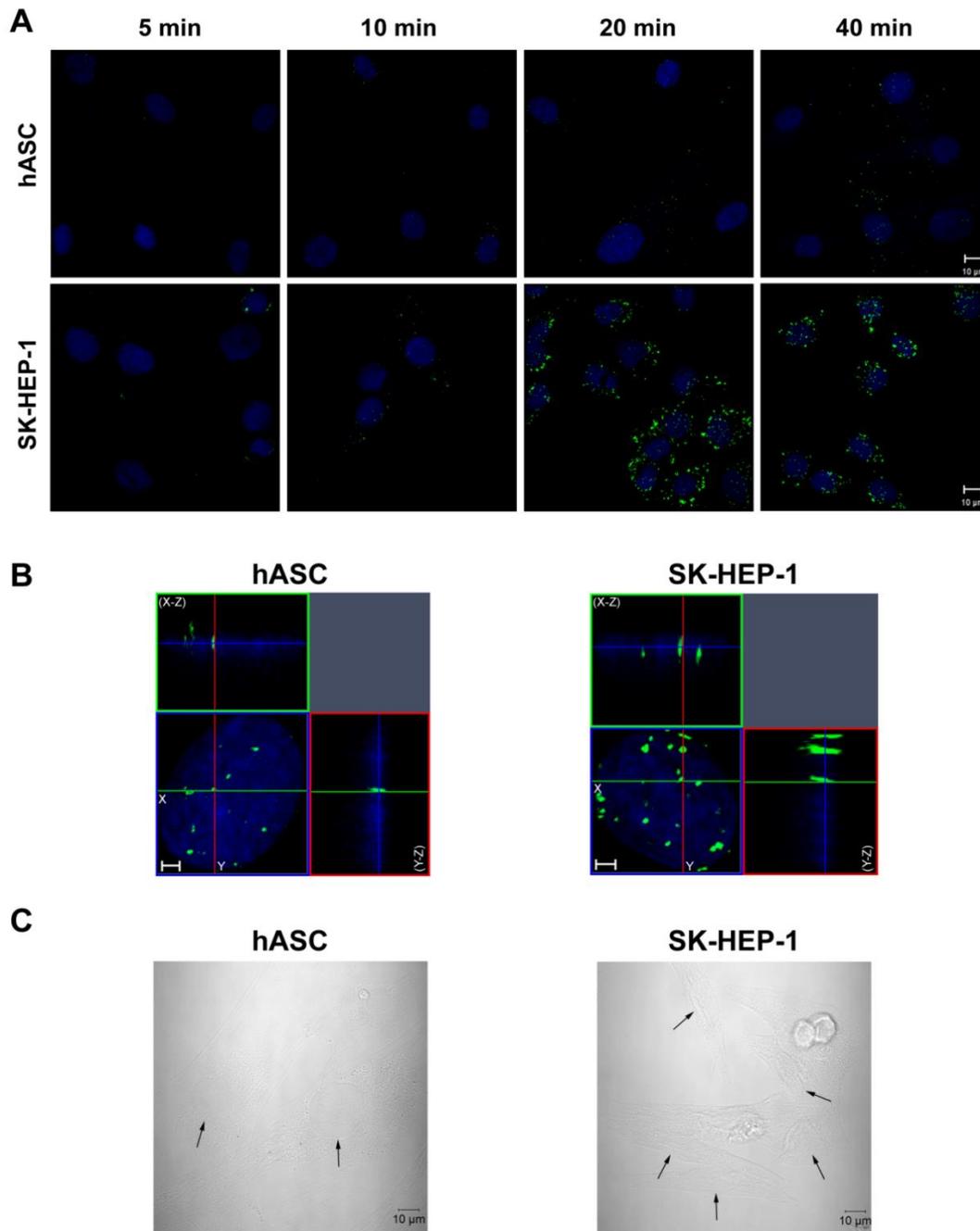


Figura 9: EGF transloca-se para o núcleo em hASC e em SK-HEP-1. Células foram estimuladas com EGF conjugado a Alexa Fluor® 488 por 5, 10, 20 e 40 minutos, tiveram seus núcleos marcados com sonda Hoechst e foram analisadas por microscopia de superresolução. **A-** Imagens representativas do plano central das células hASC e SK-HEP-1 estimuladas por diferentes tempos. Os *clusters* de EGF (em verde) estão presentes em maior quantidade no núcleo (em azul) das células a partir de 10 minutos de estímulo. As imagens são representativas de 2 experimentos de imunofluorescência, totalizando 8 a 10 campos. Barra de escala: 10 µm. **B-** Reconstrução tridimensional das seções ópticas seriais do núcleo de células hASC e SK-HEP-1 estimuladas por 40 minutos com EGF conjugado a Alexa Fluor® 488. A intercessão dos eixos X (verde) e Y (vermelho) na imagem pode ser observada nos planos X-Z (parte superior da imagem) e Y-Z (à direita). Para ambos os tipos celulares, os *clusters* de EGF (em verde) na intercessão X-Y estão no nucleoplasma (em azul) das células em X-Z e em Y-Z. Imagens representativas de 2 experimentos de imunofluorescência, totalizando 41 (hASC)

e 37 (SK-HEP-1) células. Barra de escala: 2 μ m. **C-** Imagens de campo claro representativas de hASC e SK-HEP-1, mostrando exemplos de células que foram selecionadas para a quantificação dos *clusters* de EGF no núcleo (setas). Barra de escala: 10 μ m.

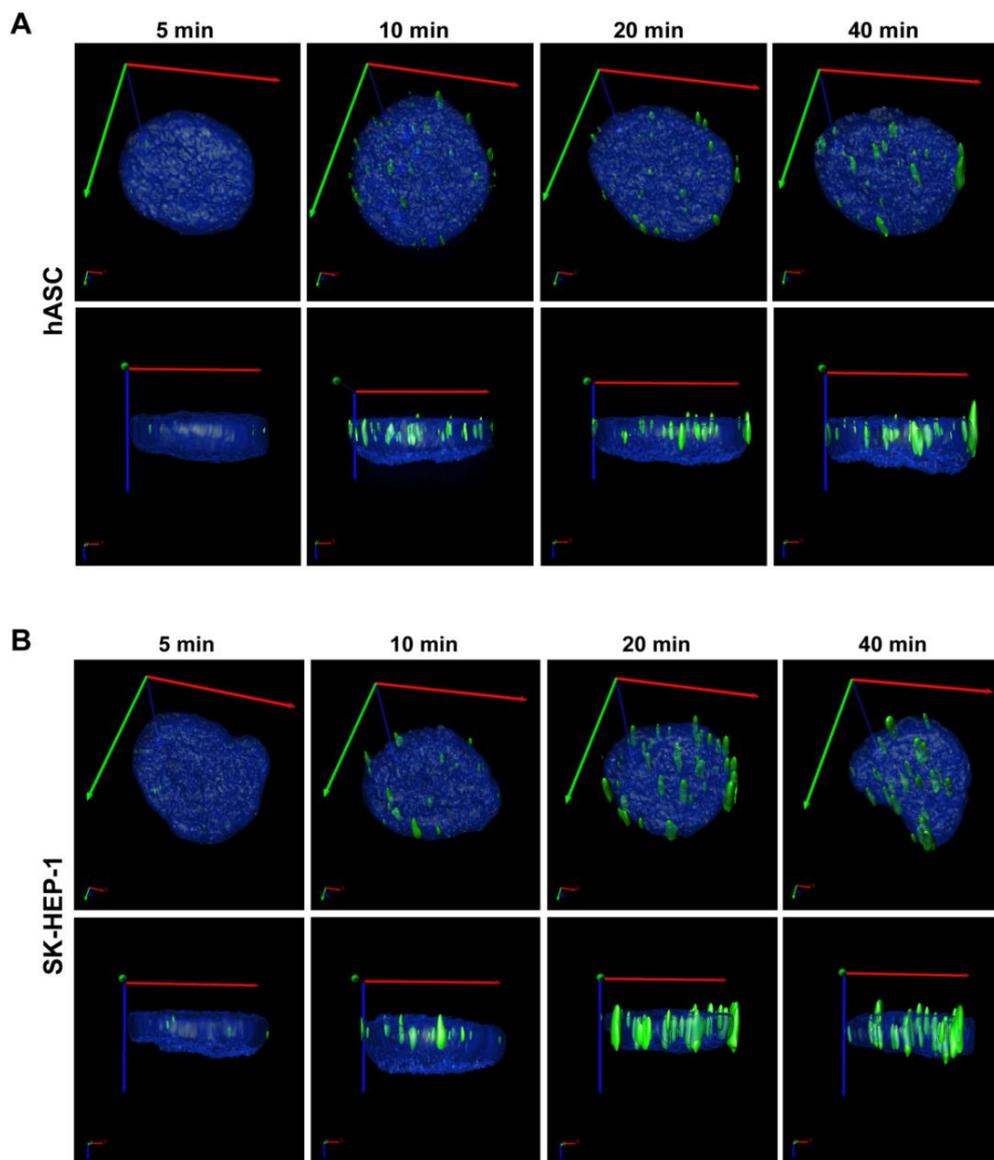


Figura 10: Reconstrução em 3D do núcleo de células estimuladas com EGF. Imagens de microscopia de superresolução de células estimuladas por 5, 10, 20 e 40 minutos, e com núcleo marcado, foram usadas para criação de superfície renderizada do núcleo e dos *clusters* de EGF em 3 dimensões por meio do programa Image Pro Plus Premier 3D. **A-** Imagens em 3D representativas do núcleo de células-tronco (hASC) estimuladas por diferentes tempos. **B-** Imagens em 3D representativas do núcleo de células SK-HEP-1 estimuladas por diferentes tempos. Em A e B, a parte superior da figura representa uma seção transversal e a parte inferior, longitudinal. Os *clusters* de EGF estão em verde e o núcleo está em azul. Eixos representados nas imagens: X (vermelho), Y (verde) e Z (azul).

O número de *clusters* de EGF por núcleo, o volume médio de cada cluster, e o volume total ocupado pela soma dos clusters em cada núcleo foram determinados para as hASC e para as SK-HEP-1 em cada tempo de estímulo a partir dos dados gerados pelo software Image Pro Plus Premier 3D. Os valores brutos da média \pm erro padrão de cada um desses parâmetros estão representados na tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros quantitativos dos *clusters* de EGF nuclear para cada tempo de estímulo em hASC e em SK-HEP-1

Tipo celular	Tempo de estímulo com EGF-488	Número médio de <i>clusters</i> por núcleo*	Volume médio de cada <i>cluster</i> ($\mu\text{m}^3/\text{cluster}$)*	Volume total dos <i>clusters</i> por núcleo (μm^3)*
hASC	5 min	7,75 ± 1,60	0,08 ± 0,02	0,64 ± 0,15
	10 min	40,98 ± 4,97	0,29 ± 0,06	14,68 ± 3,5
	20 min	24,21 ± 2,53	0,32 ± 0,05	10,08 ± 2,25
	40 min	26,93 ± 2,14	0,60 ± 0,05	17,96 ± 2,07
SK-HEP-1	5 min	10,81 ± 2,90	0,24 ± 0,10	2,85 ± 1,00
	10 min	22,16 ± 2,65	0,30 ± 0,03	8,51 ± 1,44
	20 min	29,38 ± 2,00	1,04 ± 0,11	32,88 ± 4,03
	40 min	23,54 ± 1,52	1,31 ± 0,16	30,74 ± 3,67

*: Valores representados como média ± erro padrão.

Algumas células hASC não-estimuladas apresentaram *clusters* de EGF-488, que seriam correspondentes a uma marcação inespecífica gerada pela estratégia de definição de *clusters* escolhida para as análises (seção 4.8 - Quantificação dos *clusters* de EGF). Os valores dos parâmetros obtidos para todos os tempos experimentais foram normalizados em relação aos valores obtidos para as células não-estimuladas, e essas foram incluídas nas análises estatísticas de cada parâmetro. Na apresentação dos dados (tabela 4 e figuras 11 e 13), entretanto, foram utilizados os valores brutos, e o grupo de 0 minutos de estímulo foi excluído. Em relação às SK-HEP-1, nenhuma célula não estimulada apresentou *cluster* de EGF pela quantificação realizada e, desse modo, o grupo de 0 minutos de estímulo não foi considerado nas análises desse tipo celular.

Para as hASC, das 39 células estimuladas por 5 minutos, 11 não continham *clusters* de EGF e foram eliminadas das análises, o que também ocorreu para uma das 39 células estimuladas por 20 minutos. Foi observado que o número de *clusters* de EGF no núcleo é menor em 5 minutos de estímulo em comparação aos tempos de 10, 20 e 40 minutos de estímulo, não ocorrendo diferença estatisticamente significativa entre estes (figura 11A). Em relação ao volume médio de cada *cluster*, ele também é menor em 5 minutos de estímulo, mas tem valor maior em 40 minutos de estímulo quando comparado a 10 e 20 minutos de estímulo (figura 11B). Verificando-se, então, o volume total dos *clusters* de EGF no núcleo, foi observado que ele é menor em 5 minutos de estímulo, mas não difere entre os tempos de 10, 20 e 40 minutos de estímulo (figura 11C). De acordo com o teste estatístico utilizado, não houve diferença entre o grupo 0 minutos de estímulo e o grupo 5 minutos de estímulo para as hASC.

Para as SK-HEP-1, 17 de 38 células estimuladas por 5 minutos não apresentaram *clusters* de EGF e foram eliminadas das análises. Assim como para as

hASC, foi observado que o número de *clusters* de EGF no núcleo para esse tipo celular é menor em 5 minutos de estímulo em comparação a 10, 20 e 40 minutos de estímulo (figura 12A). Entretanto, o perfil cinético do volume médio de cada cluster diferiu nas SK-HEP-1: foi menor para 5 e 10 minutos de estímulo e maior para 20 e 40 minutos de estímulo, sem diferença entre 5 e 10 minutos e entre 20 e 40 minutos (figura 12B). Esse mesmo perfil se manteve para a análise do volume total dos cluster de EGF por núcleo, que também foi menor para os tempos de estímulo de 5 e 10 minutos e maior para os tempos de estímulo de 20 e 40 minutos (figura 12C).

O gráfico da figura 13 mostra a comparação entre o perfil cinético dos dois modelos celulares analisados em relação ao volume total ocupado pelos *clusters* de EGF em cada núcleo celular (representado como média \pm erro padrão). Para as hASC, esse volume aumentou em 10 minutos de estímulo e manteve-se constante nos tempos posteriores analisados. Já para as SK-HEP-1, o volume total dos *clusters* de EGF aumentou com 20 minutos de estímulo e permaneceu constante em 40 minutos de estímulo. Durante a aquisição das imagens foi observado que as SK-HEP-1 apresentavam *clusters* de EGF nuclear maiores em comparação às hASC nesses tempos de estímulo.

Os resultados das análises de imagens de microscopia de superresolução mostram que o EGF apresenta um perfil cinético de translocação para o núcleo diferente entre hASC e SK-HEP-1.

5.5 - A síntese de EGFR nas células SK-HEP-1 é maior do que em hASC

Como as células SK-HEP-1 aparentam ter *clusters* de EGF de maior volume no núcleo em 20 e em 40 minutos em comparação às hASC, hipotetizamos se essas células tumorais sintetizam maior quantidade de EGFR do que as células-tronco. Foi realizada, então, a extração de proteínas totais de ambos os tipos celulares após 12 a 16 horas em meio sem soro fetal bovino (SFB). As proteínas foram separadas por eletroforese e foram submetidas à técnica de *Western Blot*, utilizando-se anticorpos primários anti-EGFR para verificar a quantidade desse receptor e anti- α tubulina como normalizador (figura 14A). Pela análise densitométrica das bandas proteicas de EGFR obtidas no *Western Blot*, verificou-se uma maior intensidade de marcação das bandas de EGFR para células SK-HEP-1 (média \pm erro = $3,55 \pm 0,84$) em comparação às hASC (média \pm erro = $0,63 \pm 0,18$), como mostrado na figura 14B.

Esses resultados sugerem que as células SK-HEP-1 produzem maior quantidade de EGFR do que as hASC, o que poderia estar associado aos diferentes perfis de cinética de translocação de EGF para os dois tipos celulares.

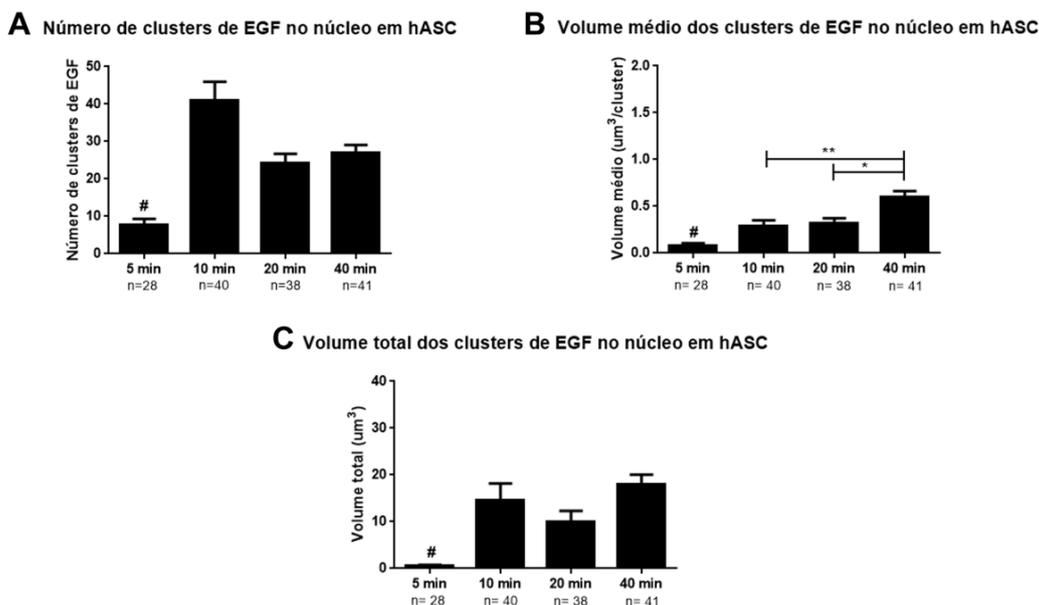


Figura 11: Clusters de EGF nuclear em hASC têm maior volume médio em 40 minutos de estímulo e não diferem em número e volume total entre 10, 20 e 40 minutos de estímulo. Análise de células estimuladas por 0 (não representado), 5, 10, 20 e 40 minutos com EGF-488. **A-** Número de *clusters* de EGF por núcleo de hASC. **B-** Volume médio dos *clusters* de EGF no núcleo de hASC. **C-** Volume total ocupado pelos *clusters* de EGF no núcleo de hASC. Teste estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Barras: média \pm erro padrão; n amostral representado abaixo do eixo X. #: difere de todos os outros grupos com $p < 0,001$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

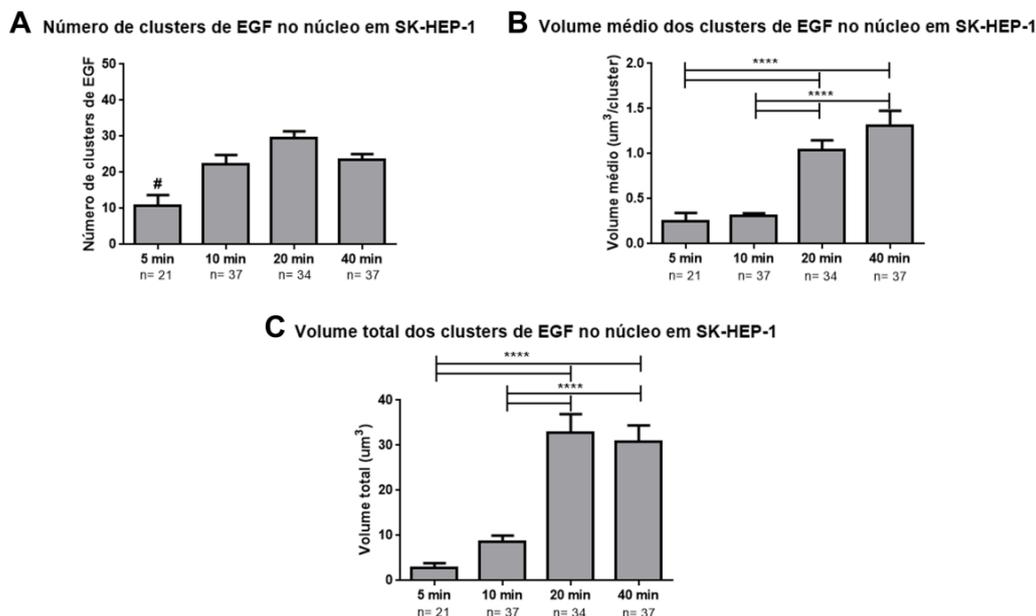


Figura 12: Clusters de EGF nuclear em SK-HEP-1 não diferem em número entre 10, 20 e 40 minutos de estímulo e têm maior volume médio e total em 20 e 40 minutos de estímulo. Análise de células estimuladas por 5, 10, 20 e 40 minutos com EGF-488. **A-** Número de *clusters* de EGF por núcleo de células SK-HEP-1. **B-** Volume médio dos *clusters* de EGF no núcleo de SK-HEP-1. **C-** Volume total ocupado pelos *clusters* de EGF no núcleo de SK-HEP-1. Teste estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Barras: média \pm erro padrão; n amostral representado abaixo do eixo X. #: difere de todos os outros grupos com $p < 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Comparação entre SK-HEP-1 e hASC quanto ao volume total dos clusters de EGF

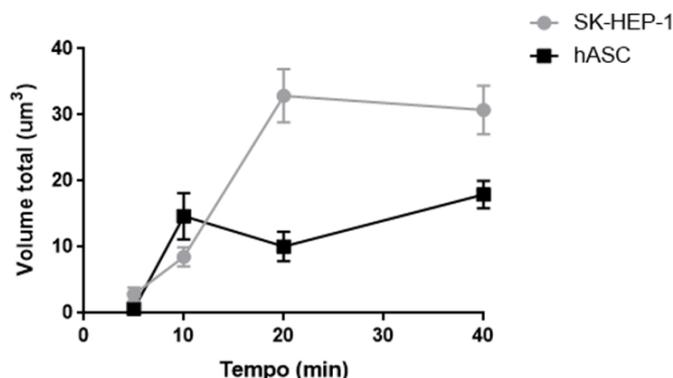


Figura 13: Perfil da cinética de translocação de EGF para o núcleo difere entre hASC e SK-HEP-1. O gráfico representa a média \pm erro padrão do volume total do núcleo ocupado pelos *clusters* de EGF em células hASC e SK-HEP-1 estimuladas por 5, 10, 20 e 40 minutos. Houve diferença no perfil da cinética de translocação do EGF entre os dois modelos celulares.

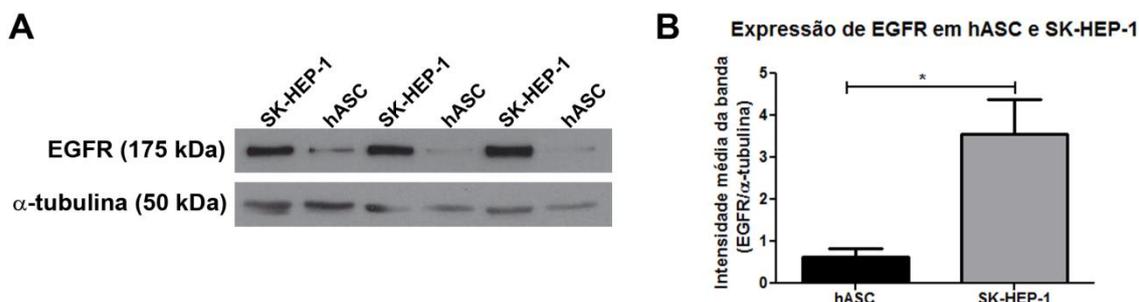


Figura 14: SK-HEP-1 produz maior quantidade de EGFR do que hASC. A- *Western Blot* de proteínas extraídas de células de ambos os tipos cultivadas por 12 a 16h em meio sem SFB. Anticorpos utilizados: anti-EGFR e anti- α tubulina. B- Análise densitométrica das bandas proteicas referentes à expressão de EGFR (175kDa) obtidas no *Western Blot*. A intensidade média das bandas foi calculada pelo software Image J. A expressão de α -tubulina (50kDa) foi utilizada como normalizador. Teste estatístico: teste T de Student; n=3; *: p<0,05.

5.6 - EGF se colocaliza com seu receptor (EGFR) em hASC e em SK-HEP-1

Para verificar se o EGF transloca para o núcleo com o seu receptor, foi realizada uma análise de colocalização entre EGF-488 e EGFR marcado com anticorpo para a porção citoplasmática desse receptor. Essa análise foi feita em células hASC e SK-HEP-1 estimuladas por 10 e por 40 minutos com o EGF. A figura 15 apresenta imagens da projeção da máxima intensidade das seções ópticas das séries Z adquiridas por microscopia de superresolução. As marcações para EGF (em verde), para EGFR (em vermelho), para o núcleo (em azul) e a sobreposição delas estão representadas na parte superior das figuras 15A e 15B. Na imagem de sobreposição é possível observar a colocalização entre ligante e receptor (representada por pontos amarelos) para hASC (figura 15A) e SK-HEP-1 (figura 15B). Na parte

inferior dessas figuras, à esquerda, estão representadas as análises de colocação. Os diagramas mostram a dispersão dos pixels colocados no terceiro quadrante. Esses pixels estão marcados por pontos brancos nas imagens à direita do diagrama das figuras 15A e 15B.

O coeficiente de correlação de Pearson (R) obtido pelas análises das imagens adquiridas estão entre 0,23 e 0,73 para hASC e entre 0,74 e 0,89 para SK-HEP-1, como apresentado nas tabelas na parte inferior à direita das figuras 15 A e 15 B. Como os valores de R para SK-HEP-1 são mais próximos de 1, a correlação entre ligante e receptor é maior para este tipo celular quando comparado às hASC nesta análise. Entretanto, como todos os valores de R são maiores que zero, há uma correlação positiva entre os canais de EGF e EGFR para ambos os tipos celulares analisados.

5.7 - O retículo nucleoplasmático está presente nas hASC e nas SK-HEP-1

A presença e a estrutura das invaginações do retículo nucleoplasmático foram verificadas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão. A figura 16 mostra algumas invaginações dessa organela no núcleo das hASC. Elas são do tipo II, formadas pelas membranas internas e externas do envelope nuclear, e algumas parecem estar associadas ao nucléolo (figura 16A, 16B e 16D). É possível ver alguns ribossomos e vesículas citoplasmáticas no cerne dessas invaginações (figura 16D). Durante a aquisição das imagens foi possível perceber que a maioria das células na amostra não apresentava retículo nucleoplasmático.

As células SK-HEP-1 também apresentam retículo nucleoplasmático, como pode ser visto na figura 17. Algumas invaginações parecem estar associadas ao nucléolo (figura 17B, 17C e 17D) e a maioria são do tipo II, com presença de poro nuclear (figura 17E) e cerne citoplasmático (figura 17A). Apenas em uma célula da amostra foi encontrada invaginação do tipo I, composta somente pela membrana interna do envelope nuclear, gerada a partir de uma invaginação do tipo II (figura 17F). A maioria das células SK-HEP-1 analisadas na amostra apresentava retículo nucleoplasmático, e esse era composto por invaginações que parecem maiores e mais frequentes em comparação às presentes nas hASC.

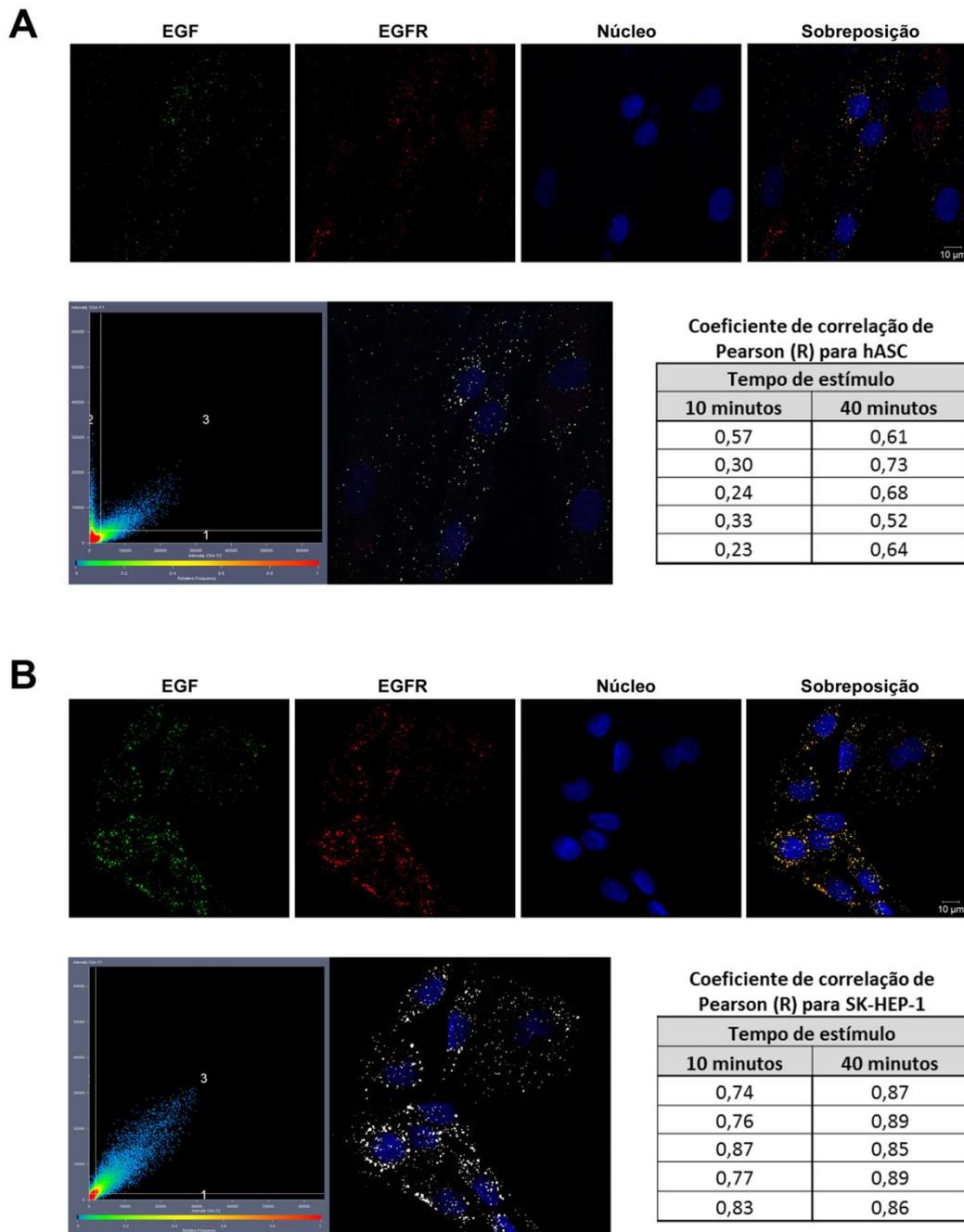


Figura 15: EGF se colocaliza com seu receptor (EGFR) em hASC e em SK-HEP-1. Células estimuladas com EGF conjugado a Alexa Fluor® 488 por 10 e 40 minutos e marcadas com anticorpo anti-EGFR e com sonda Hoechst foram analisadas por microscopia de superresolução. As seções ópticas de cada série Z adquirida foram utilizadas para gerar uma imagem bidimensional com a projeção de máxima intensidade de pixels. **A e B- Parte superior:** imagens de células hASC (A) e SK-HEP-1 (B) estimuladas por 40 minutos representando as marcações realizadas (EGF: verde; EGFR: vermelho; núcleo: azul) e a sobreposição delas, com a colocalização entre EGF e EGFR em amarelo. Barra de escala: 10 µm. **Parte inferior:** à esquerda, diagrama de dispersão dos pixels com colocalização entre os canais Alexa Fluor® 488 (EGF) e Alexa Fluor® 555 (EGFR) da imagem representada na respectiva parte superior. Imagem com os pixels colocalizados em branco (coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,73 em A e 0,87 em B). À direita, tabela com valores do coeficiente de correlação de Pearson calculado pelo software ZEN *lite Black edition* para todas as imagens de células hASC (A) e SK-HEP-1 (B) estimuladas por 10 e 40 minutos. Imagens representativas de 1 experimento de imunofluorescência, totalizando 10 campos.

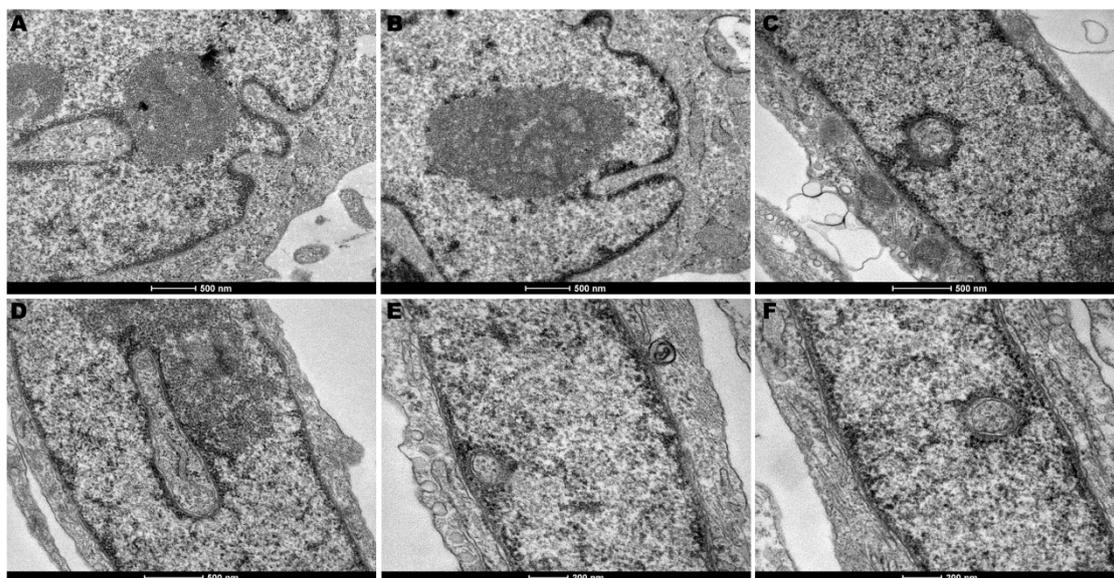


Figura 16: Reticulo nucleoplasmático em hASC. Invaginações do envelope nuclear para o nucleoplasma estão presentes em algumas células analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. **A e B** – Invaginações do tipo II associadas ao nucléolo. **C, D, E e F**- Cortes transversais de invaginações do tipo II no nucleoplasma. Vesículas são visíveis no cerne citoplasmático da invaginação em D, que também está associada ao nucléolo. Aumentos: 16500 x (barra de escala: 500 nm) e 43000 x (barra de escala: 200 nm).

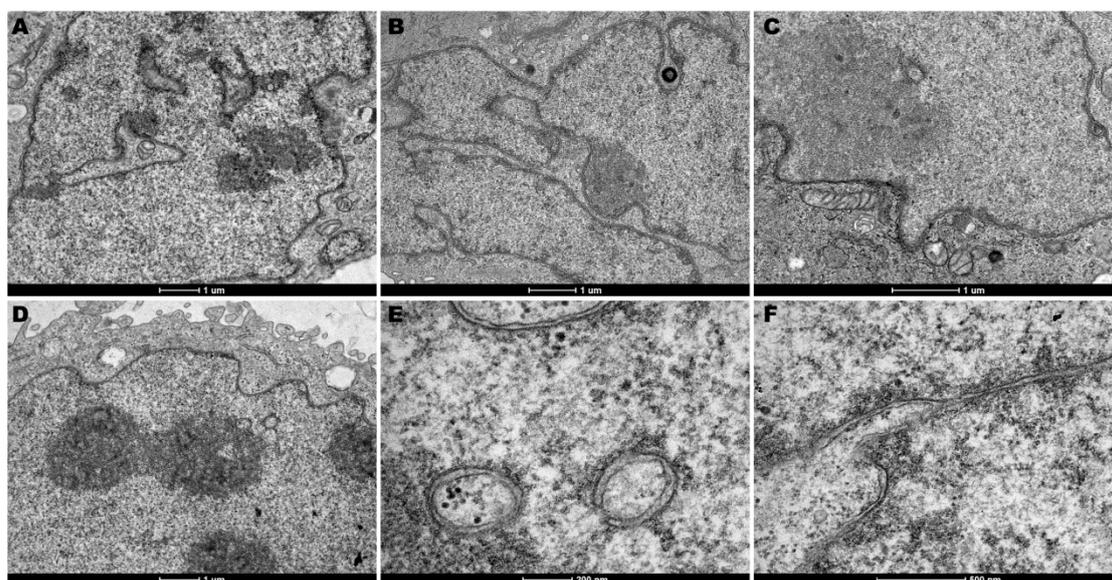


Figura 17: Reticulo nucleoplasmático em SK-HEP-1. Invaginações do envelope nuclear para o nucleoplasma estão presentes na maioria das células analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. **A**- Invaginações do tipo II com cerne citoplasmático, sendo possível verificar mitocôndria em uma delas. **B, C e D**- Invaginações associadas ao nucléolo. **E**- Maior aumento das invaginações em D, evidenciando as duas membranas do envelope nuclear e a presença de complexo do poro nuclear. **F**- Invaginação do tipo I formada a partir de uma invaginação do tipo II. Aumentos: 9900 x (barra de escala: 1 μm), 16500 x (barra de escala: 500 nm) e 43000 x (barra de escala: 200 nm).

Por meio das análises de microscopia de superresolução de células com o envelope nuclear e o nucléolo marcados por imunofluorescência (figura 18A), também

é possível verificar a presença do retículo nucleoplasmático. As invaginações do envelope nuclear, marcadas com anticorpo anti-lâmina B2, estão no nucleoplasma em ambos os tipos celulares, como pode ser visto nos planos X-Z e Y-Z das reconstruções tridimensionais das seções ópticas seriais do núcleo celular (figura 18B). Nessa figura também é possível observar que algumas dessas invaginações estão associadas ao nucléolo, marcado com anticorpo anti-fibrilarina. Pela visualização das imagens de microscopia de superresolução do núcleo celular, as células SK-HEP-1 apresentam retículo nucleoplasmático com invaginações mais profundas e em maior quantidade, enquanto as hASC possuem invaginações mais curtas e em menor quantidade (figura 18C), o que também foi observado por microscopia eletrônica. Todas as imagens apresentadas na figura 18 são de células não estimuladas por EGF.

5.8 - EGF tem distribuição difusa no núcleo e pode ser encontrado no retículo nucleoplasmático em hASC e em SK-HEP-1

Após verificar a cinética de translocação de EGF para o núcleo e a presença do retículo nucleoplasmático em ambos os tipos celulares, avaliamos se os *clusters* de EGF nuclear estariam nesta organela ou no nucléolo, que pode estar associado a ela. Para tal, células estimuladas por 40 minutos com EGF conjugado a Alexa Fluor® 488 e marcadas com anticorpo anti-lâmina B2 (para evidenciar o retículo nucleoplasmático), com anticorpo anti-fibrilarina (para evidenciar o nucléolo) e com sonda Hoechst (para identificação do núcleo) foram avaliadas quanto à localização nuclear dos *clusters* de EGF. A figura 19A representa a seção central da série de seções ópticas do núcleo para os dois tipos celulares. É possível verificar que os *clusters* de EGF estão espalhados pelo nucleoplasma (em azul) de forma difusa em todas as células analisadas. Alguns *clusters* (em verde) se localizam no retículo nucleoplasmático (em vermelho) e no nucléolo (em laranja) em hASC e em SK-HEP-1, como indicado pelas setas brancas. Os insertos retangulares na superfície de cada núcleo e próximos às setas correspondem aos *clusters* de EGF apontados por elas em maior aumento, que estão em amarelo claro devido à sobreposição das marcações (figura 19A). As imagens de reconstrução tridimensional das seções ópticas em série do núcleo de ambos os tipos celulares confirmam a presença de *clusters* de EGF no retículo nucleoplasmático em hASC e em SK-HEP-1 (figura 19B).

Em resumo, esses resultados indicam que os *clusters* de EGF nuclear estão distribuídos de forma difusa por todo o nucleoplasma e podem estar localizados no retículo nucleoplasmático e no nucléolo de ambos os tipos celulares.

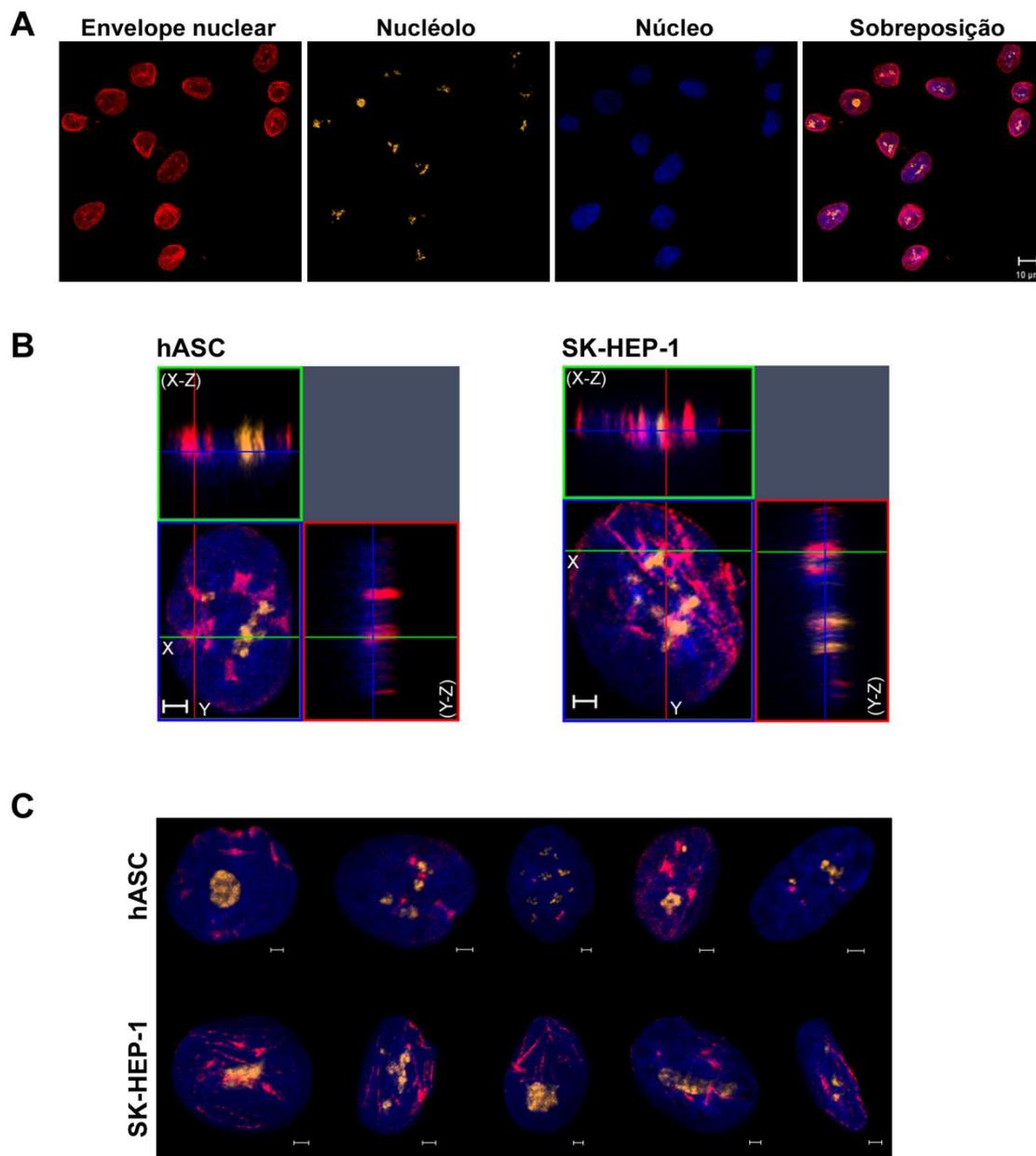


Figura 18: SK-HEP-1 apresenta invaginações do retículo nucleoplasmático visualmente em maior quantidade e profundidade do que hASC. **A-** Imagem de microscopia de superresolução do plano central de células SK-HEP-1 mostrando a marcação do envelope nuclear por anticorpo anti-lâmina B2 (em vermelho), do nucléolo por anticorpo anti-fibrilarina (em laranja) e do DNA nuclear pela sonda Hoechst (em azul). Barra de escala: 10 μm . **B-** Reconstrução tridimensional das seções ópticas em série do núcleo celular. A intercessão dos eixos X (verde) e Y (vermelho) na imagem pode ser observada nos planos X-Z (parte superior da imagem) e Y-Z (à direita). Para ambos os tipos celulares, as invaginações do envelope nuclear (em vermelho) presentes na intercessão X-Y estão no nucleoplasma (em azul) das células em X-Z e em Y-Z. Algumas das invaginações estão associadas ao nucléolo (em laranja). Barra de escala: 2 μm . **C-** Imagens representativas do plano central do núcleo de células de ambos os modelos. As células SK-HEP-1 apresentam retículo nucleoplasmático (em vermelho) com invaginações visualmente mais longas e em maior quantidade do que as hASC. Barra de escala: 2 μm . As imagens em B e C são representativas de 3 experimentos de imunofluorescência totalizando 62 (hASC) e 59 (SK-HEP-1) células não estimuladas por EGF. Elas foram ajustadas no software ZEN *lite Black edition* para evidenciar apenas as invaginações do envelope nuclear, e não o envelope nuclear como um todo.

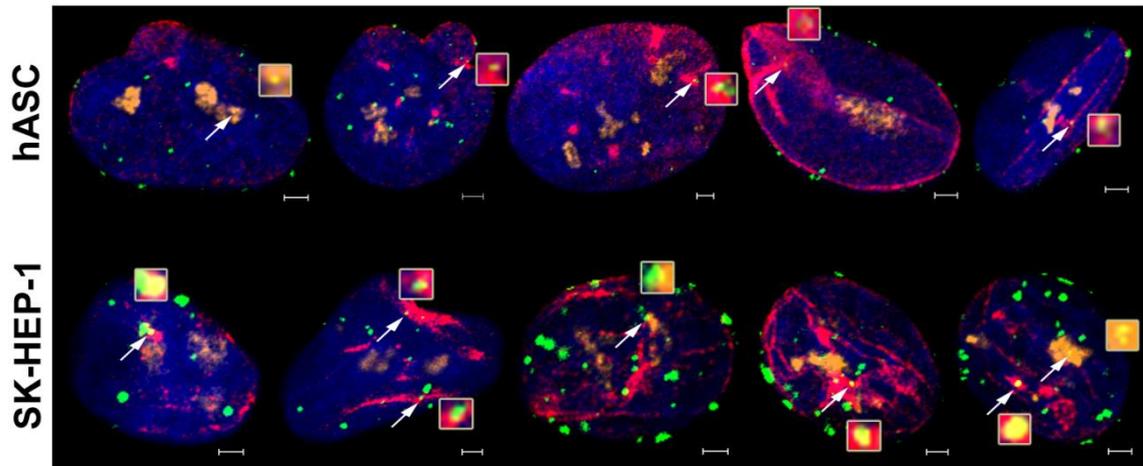
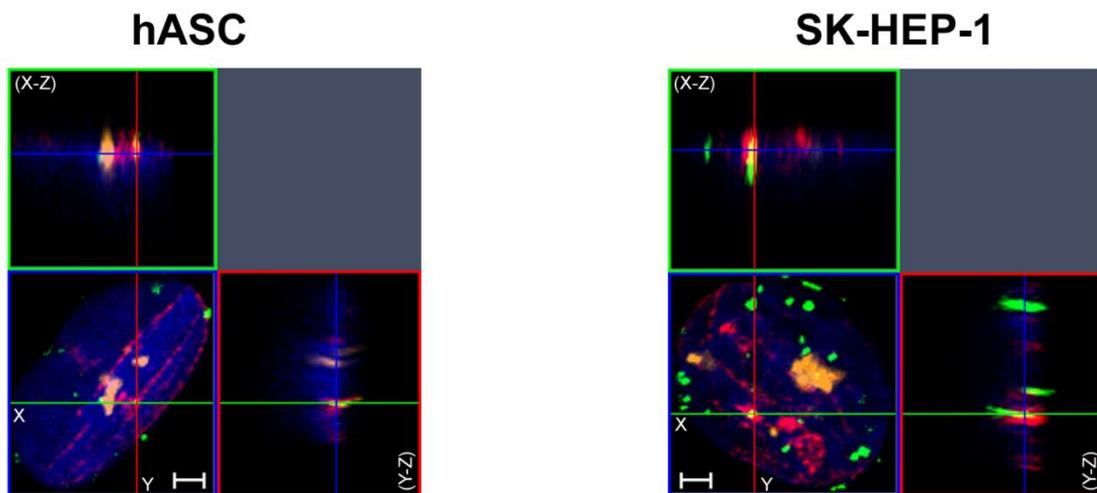
A**B**

Figura 19: EGF nuclear está presente no retículo nucleoplasmático e nucléolo. Células foram estimuladas com EGF conjugado a Alexa Fluor® 488 por 40 minutos e tiveram o retículo nucleoplasmático marcado com anticorpo anti-lâmina B2, o nucléolo marcado com anticorpo anti-fibrilarina e o núcleo marcado com sonda Hoechst. **A-** Imagens representativas do plano central do núcleo de células hASC e SK-HEP-1 estimuladas. Os *clusters* de EGF (em verde) estão espalhados pelo nucleoplasma (em azul) em ambos os tipos celulares. As setas brancas apontam *clusters* de EGF localizados no retículo nucleoplasmático (em vermelho) e no nucléolo (em laranja). Esses clusters estão em amarelo claro e em maior aumento nos inserts retangulares próximos às setas que os evidenciam. Barra de escala: 2 µm. **B-** Reconstrução tridimensional das seções ópticas seriais de células hASC e SK-HEP-1 estimuladas. A interseção dos eixos X (verde) e Y (vermelho) na imagem pode ser observada nos planos X-Z (parte superior da imagem) e Y-Z (à direita). Para ambos os tipos celulares, os *clusters* de EGF (em verde) na interseção X-Y estão no retículo nucleoplasmático (em vermelho) das células em X-Z e em Y-Z. As imagens em A e B, de microscopia de superresolução, são representativas de 2 experimentos de imunofluorescência, totalizando 41 (hASC) e 37 (SK-HEP-1) células. Elas foram ajustadas no software ZEN lite Black edition para evidenciar apenas as invaginações do envelope nuclear. Barra de escala: 2 µm.

6. DISCUSSÃO

A presença de EGFR no núcleo está relacionada a um fenótipo proliferativo e tumoral, além de estar associada à resistência de pacientes a tratamentos para diferentes tipos de câncer e a um pior prognóstico dessa classe de doenças (HAN; LO, 2012; LEE; WANG; HUNG, 2015). Dada a importância de se estudar a translocação dessa proteína para o núcleo em diferentes tipos celulares, o presente trabalho avaliou aspectos relacionados à cinética do tráfego de EGF para o núcleo, bem como sua localização nesse compartimento celular, em dois tipos celulares mesenquimais, sendo um deles tumoral.

Os modelos celulares utilizados neste trabalho foram caracterizados quanto aos aspectos morfológico (figura 5) e imunofenotípico (figura 6) e quanto à capacidade de diferenciação em linhagens mesenquimais (figuras 7 e 8). Por essas análises, as células isoladas de tecido adiposo humano (hASC) proveniente de lipoaspirado e abdominoplastia apresentavam características de células-tronco mesenquimais, como: aderência ao plástico; morfologia fibroblastóide; expressão de marcadores estromais (CD105 e CD90); ausência de expressão de marcadores hematopoiéticos (CD11b e CD45), e capacidade de se diferenciarem em linhagens adipogênicas e osteogênicas. Essas características foram verificadas anteriormente pelos pioneiros no isolamento dessas células (ZUK et al., 2001) e condizem com o estabelecido pelo novo critério de definição de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (BOURIN et al., 2013).

Assim como caracterizado por Heffelfinger e colaboradores em 1992, as células SK-HEP-1 utilizadas nesse trabalho apresentavam morfologia heterogênea (figura 5), com células epitelióides ou endotelióides aderentes e células arredondadas pouco aderentes (HEFFELFINGER et al., 1992). A expressão dos marcadores mesenquimais CD90 e CD105 por essas células e a capacidade que possuem de se diferenciarem em linhagem osteogênica está de acordo com o trabalho de Eun e colaboradores em 2014, o que sugere que as SK-HEP-1 sejam células-tronco mesenquimais tumorais, como apresentado por esses autores (EUN et al., 2014). Apesar da porcentagem de marcação para CD45 não ter sido negativa (tabela 3), ela está muito próxima do limiar estabelecido por BOURIN e colaboradores em 2013 (menor que 2 % de marcação). As condições nas quais a imunofenotipagem foi realizada, como as referentes ao protocolo e ao equipamento utilizados neste trabalho, podem ser melhor padronizadas para averiguar a frequência de marcação para CD45. Além disso, para confirmar o perfil tronco-mesenquimal das SK-HEP-1, será necessário realizar a imunofenotipagem com subculturas em diferentes passagens utilizando, além dos

apresentados neste trabalho, outros marcadores para células-tronco mesenquimais estabelecidos pelo critério de BOURIN e colaboradores, como o CD13, CD73, CD29 (positivos) e CD31 e CD235a (negativos) (BOURIN et al., 2013).

A coloração de gotículas lipídicas por óleo vermelho O para evidenciar a diferenciação em linhagem adipogênica das SK-HEP-1 ocorreu não só para as células cultivadas em meio adipogênico, mas também para as células controles, cultivadas em meio completo (figura 8). Devido a isso, não é possível afirmar que essas células possuem capacidade de diferenciação em linhagem adipogênica. Entretanto, as imagens obtidas por este trabalho, tanto das células cultivadas em meio adipogênico quanto das células controles, são visivelmente semelhantes à imagem apresentada por EUN e colaboradores, em 2014, para exemplificar a diferenciação adipogênica das SK-HEP-1. Como esse estudo anterior não mostra imagens de células controles, não é possível comparar a coloração dessas com as obtidas neste trabalho.

De acordo com (BOURIN et al., 2013), o óleo vermelho O pode corar lipídeos intracelulares presentes em outros tipos de células que não as da linhagem adipogênica. Isso poderia explicar a marcação por esse corante de ambas as células experimentais e controles no presente trabalho. Portanto, para verificar se as células SK-HEP-1 são capazes de se diferenciar em linhagem adipogênica, é necessário analisar a expressão de marcadores de adipogênese, como adiponectina, proteína que se liga a ácidos graxos 4 (FABP4), leptina, receptor ativado por proliferador de peroxisomo γ (PPAR γ) e glicerol 3 fosfato desidrogenase (BOURIN et al., 2013). Outra forma de comprovar o perfil tronco-mesenquimal dessas células seria verificar a capacidade de diferenciação dessas em outras linhagens mesenquimais, como condrogênica e miogênica, o que foi previamente apresentado para as hASC (ZUK et al., 2002).

Os modelos celulares caracterizados foram, então, avaliados quanto à presença de EGF biotilado complexado a Alexa Fluor[®] 488 estreptavidina (EGF-488) no núcleo. A presença do EGFR no núcleo após sua ativação foi observada para vários modelos celulares e tecidos proliferativos, como hepatócitos, tireóide, células basais da mucosa oral, placenta, células epiteliais imortalizadas e diversos tipos de câncer e linhagens tumorais (LIN et al., 2001; LO; HUNG, 2006). Alguns ligantes do EGFR, como EGF, TGF α e HB-EGF, também foram observados no núcleo (WANG; HUNG, 2012). Em um estudo anterior do nosso grupo, foi mostrada a translocação de EGF-488 para o núcleo de células SK-HEP-1 por microscopia confocal em tempo real. Verificou-se, ainda, que o EGF nuclear se colocalizava com o EGFR (CAMPOS et al., 2011).

Neste trabalho, também foi possível observar a presença de EGF-488 no núcleo de células SK-HEP-1 (figura 9), mas por uma técnica de maior resolução quando

comparada à microscopia confocal. O LSM 880 com detector de *AiryScan* permite a aquisição de imagens com maior resolução lateral (140 nm a 488 nm de excitação) e axial (400 nm a 488 nm de excitação), o que gera uma resolução global 1,7 vezes maior do que a microscopia confocal convencional (WEISSHART, 2014). Devido a isso, a distinção de objetos fluorescentes próximos é mais eficaz. Com o uso da microscopia de superresolução, verificamos a presença de EGF-488 também no núcleo das hASC, sendo o primeiro relato dessa observação (figura 9).

Estudos pioneiros observaram que o estímulo de células com EGF marcado por ¹²⁵I (CARPENTER; COHEN, 1976), fluoróforos (GORDEN et al., 1978) ou ferritina (HAIGLER; MCKANNA; COHEN, 1979) leva à associação desse ligante ao receptor, e esses complexos receptor-ligante se aglomeram em regiões revestidas da membrana plasmática, formando *clusters*. Utilizamos, então, essa denominação para nos referirmos aos conjuntos de EGF-488 observados nas análises, e assumimos que o EGFR é translocado juntamente ao ligante utilizado neste estudo.

A cinética de translocação de EGFR para o núcleo foi observada em estudos anteriores. Lin e colaboradores verificaram, por fracionamento das porções citoplasmáticas e nucleares e *Western blot* das proteínas extraídas de cada fração, que células A431 estimuladas por EGF durante 1 minuto já apresentavam EGFR no núcleo. O pico da translocação do receptor para o núcleo ocorreu entre 15 e 30 minutos nesse estudo (LIN et al., 2001). Utilizando a mesma abordagem, nosso grupo verificou, em estudo anterior, a cinética de translocação de EGFR para o núcleo em células SK-HEP-1. Foi observado que, após 2,5 minutos de estímulo com EGF, o receptor era detectado no núcleo, sendo que o pico da translocação ocorreu em 10 minutos de estímulo (CAMPOS et al., 2011).

Neste trabalho, diferentemente dos apresentados, realizamos uma análise em 3 dimensões de imagens de microscopia de superresolução para verificar a cinética de translocação de EGF para o núcleo. Para tal análise, foram utilizadas células estimuladas por 0, 5, 10, 20 e 40 minutos com EGF-488 que apresentaram morfologia e integridade normais nas imagens de campo claro (como exemplificado na figura 9C). O software Image Pro Plus Premier 3D foi escolhido para o estudo da cinética de translocação de EGF para o núcleo por possibilitar a identificação dos objetos marcados nas imagens de microscopia de superresolução e a mensuração desses. Com o uso desse software, foi criada uma superfície renderizada tridimensional para cada núcleo celular e para cada *cluster* de EGF isoladamente (figura 10). Um limiar inferior médio de intensidade de fluorescência dos pixels no canal 488 foi definido para que a superfície tridimensional criada em torno dessa marcação delimitasse os pixels marcados que corresponderiam aos *clusters* de EGF de modo a abranger o mínimo do

background dela (pixels com intensidade de fluorescência baixa). Como as células estimuladas por 40 minutos apresentaram, visualmente, *clusters* de maior volume (o que permitiu distingui-los com maior precisão do *background* da marcação), elas foram escolhidas para se estabelecer esse limiar inferior médio para cada tipo celular, o qual foi utilizado para a análise dos outros tempos de estímulo. Os *clusters* de EGF nuclear tridimensionais obtidos para todos os tempos foram avaliados quanto ao número e ao volume para ambos os tipos celulares.

Comparamos a cinética de translocação de EGF para o núcleo entre um modelo de célula-tronco mesenquimal (hASC) e um modelo de célula mesenquimal tumoral (SK-HEP-1). Como essas células apresentam aspectos proliferativos e fisiológicos distintos, o processo de translocação de EGFR pode ser diferencial entre elas. As investigações sobre a biologia do receptor e sua translocação utilizaram, na maioria das vezes, células tumorais que apresentam alta expressão de EGFR (HUNTER; COOPER, 1981); (WANG et al., 2010b); (LIAO; CARPENTER, 2007). Estudos comparativos entre células tumorais e células normais quanto ao processo de translocação de EGFR para o núcleo são desconhecidos.

A análise da cinética para as hASC mostrou que a quantidade de *clusters* de EGF não difere entre os tempos de 10, 20 e 40 minutos de estímulo, mas o volume médio de cada *cluster* é maior em 40 minutos de estímulo (figura 11). Isso sugere que, nesse tempo, *clusters* existentes ou recém translocados se aglomeram uns aos outros. Entretanto, essa aglomeração não é suficiente para gerar uma diferença significativa em relação ao número de *clusters* e ao volume total ocupado por eles entre os tempos supracitados. Assim sendo, a análise da cinética de translocação de EGF para as hASC sugere que essas células atinjam um equilíbrio de translocação para o núcleo com 10 minutos de estímulo. Como o tempo de 5 minutos não diferiu estatisticamente do tempo de 0 minutos para todos os parâmetros observados, consideramos que não há presença significativa de *clusters* de EGF no núcleo das hASC para esse tempo de estímulo.

Para as SK-HEP-1, o número de *clusters* de EGF foi menor para 5 minutos de estímulo e não diferiu entre 10, 20 e 40 minutos, mas o volume médio de cada *cluster* e o volume total ocupado pelos *clusters* foi maior para 20 e 40 minutos em comparação a 5 e 10 minutos de estímulo, sem diferença estatística entres estes grupos (figura 12). Esses dados também sugerem uma aglomeração dos *clusters* de EGF com o passar do tempo. Tal aglomeração não alterou o número de *clusters* nos tempos supracitados, mas, diferentemente das hASC, ela foi importante para aumentar o volume total de EGF no núcleo a partir de 20 minutos. Isso sugere que, para as SK-HEP-1, a translocação de EGF da membrana plasmática para o núcleo

continuou ocorrendo de forma significativa em 20 minutos de estímulo, e esses *clusters* se aglomeraram aos já existentes formando *clusters* de maior volume a partir desse tempo.

Ao compararmos o perfil da cinética de translocação de EGF para o núcleo, verificamos, então, que ele difere entre os dois tipos celulares (figura 13). Para as hASC detectamos a presença significativa de EGF nuclear em 10 minutos de estímulo e, a partir desse tempo, não há aumento dessa proteína no núcleo. Já para as SK-HEP-1 detectamos EGF nuclear a partir de 5 minutos, ocorrendo um aumento dessa proteína no núcleo em 20 minutos de estímulo. Comparar essa cinética entre os dois grupos por métodos estatísticos conhecidos não é adequado, já que os dados obtidos para as hASC são normalizados pelos valores das células não estimuladas, e os dados obtidos para as SK-HEP-1 são brutos. Devido a isso, optamos por apresentar apenas a comparação do perfil cinético. Entretanto, numa análise qualitativa, as SK-HEP-1 aparentam ter maior volume de EGF nuclear aos 20 e 40 minutos de estímulo quando comparadas às hASC. Para verificar se a cinética permanece constante para os dois tipos celulares, é necessário avaliar a translocação de *clusters* de EGF em tempos maiores de estímulo e observar se o volume total de EGF no núcleo se altera com o tempo.

Dado que a quantidade de EGF adicionada durante o estímulo para os dois tipos celulares é a mesma, e que esse ligante se associa ao seu receptor formando *clusters* de complexos EGF-EGFR que são internalizados (ZIDOVETZKI et al., 1981; HAIGLER; MCKANNA; COHEN, 1979), a diferença no perfil da cinética de translocação de EGF para o núcleo entre SK-HEP-1 e hASC pode estar associada à expressão de seu receptor na membrana dessas células. Células tumorais podem apresentar uma maior expressão de EGFR, e essa superexpressão pode estar associada a esse fenótipo (YARDEN; PINES, 2012). Por meio das técnicas de extração de proteínas totais e *Western Blot*, verificamos que a expressão de EGFR é maior em SK-HEP-1 do que em hASC (figura 14). Isso sugere que, por ter maior quantidade de receptores expressos na membrana, a quantidade de EGF que pode ser internalizado por associação a esses receptores também é maior, o que leva ao aumento do volume de EGF no núcleo em SK-HEP-1 em tempos prolongados de estímulo. Como as hASC produzem menor quantidade de receptores, a quantidade de ligante que pode ser internalizado também é menor, e a célula atinge seu equilíbrio de translocação em tempos anteriores quando comparado às SK-HEP-1. Além disso, essa diferença na produção do receptor reflete a biologia de cada tipo celular, e a translocação de EGFR para o núcleo pode ser diferente entre as duas células por elas apresentarem necessidades fisiológicas distintas.

Uma vez que verificamos a cinética de translocação do ligante, e não do receptor, foi preciso confirmar a colocalização entre EGF e EGFR em hASC e SK-HEP-1. A análise feita nas imagens mostrou que EGF e EGFR se colocalizam em ambos os tipos celulares (figura 15). O coeficiente de correlação de Pearson maior do que 0 indica uma correlação positiva para o receptor e o ligante, ou seja, o valor de intensidade de fluorescência de uma marcação corresponde ao valor de intensidade de fluorescência para a outra marcação no mesmo pixel. Esse coeficiente mede o grau em que a variabilidade das intensidades dos pixels para ambos os canais pode ser explicada por uma relação linear simples entre as duas marcações. Porém, essa relação pode não ser linear em alguns casos, e, devido a isso, o Coeficiente de Pearson assume um valor abaixo do esperado (DUNN; KAMOCKA; MCDONALD, 2011). Portanto, o fato de esse coeficiente ter sido menor para hASC não significa ausência de colocalização, mas pode indicar que a proporção entre as intensidades das marcações em cada pixel não é linear ou que ocorre presença do receptor não associado ao ligante.

A aglomeração dos *clusters* de complexos EGF-EGFR no núcleo, sugerida para ambas as células devido ao aumento do volume médio de cada *cluster* em tempos posteriores de estímulo (figuras 11B e 12B), poderia ser explicada por possíveis localizações subnucleares preferenciais do EGFR. Esses locais, portanto, estariam relacionados a alguma função mais específica do receptor no núcleo ou ao seu mecanismo de transporte para essa organela. O envelope nuclear poderia ser uma localização preferencial, uma vez que ele está envolvido com o transporte de EGFR para o núcleo de acordo com o modelo de translocação por *INTERNET*. Nesse modelo, o EGFR, do retículo endoplasmático, atinge a membrana nuclear interna do envelope nuclear por uma via de endomembranas e é extraído para o nucleoplasma por interação com Sec61 β , presente na INM (WANG et al., 2012). Tendo isso em vista, é possível que outra organela nuclear esteja envolvida no tráfego de EGFR para o nucleoplasma e seja local de aglomeração de *clusters* de EGF-EGFR. Essa organela seria o retículo nucleoplasmático (RN), uma vez que suas invaginações são contínuas ao envelope nuclear e têm papel no transporte nucleo-citoplasmático de moléculas (MALHAS; GOULBOURNE; VAUX, 2011). Assim sendo, os *clusters* de EGFR poderiam trafegar pela membrana interna do envelope nuclear para essa organela, de onde seriam transportados para o nucleoplasma.

Em estudos anteriores, foi verificada a presença do RN em células SK-HEP-1 (ECHEVARRÍA et al., 2003), mas não se tinha conhecimento sobre a presença dessa organela em hASC. O presente estudo confirma, por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (figuras 16 e 17) e por microscopia de superresolução (figura 18), a

existência de invaginações do envelope nuclear no nucleoplasma de ambos os modelos celulares utilizados. As características das invaginações observadas por MET atendem aos critérios de classificação definidos por Malhas e colaboradores, em 2011, para retículo nucleoplasmático do tipo II e do tipo I (observado em apenas uma célula) (MALHAS; GOULBOURNE; VAUX, 2011). A microscopia de superresolução foi uma estratégia que permitiu analisar o retículo nucleoplasmático em 3 dimensões e, como consequência, verificar algumas características analisadas por MET, como a presença de invaginações no nucleoplasma e a associação de algumas delas com o nucléolo.

Por meio da microscopia de superresolução, realizamos a análise da localização dos *clusters* de EGF no RN e no nucléolo para os dois modelos celulares utilizando as células estimuladas por 40 minutos, uma vez que, nesse tempo, os *clusters* podem ser melhor visualizados por apresentarem maior volume. Verificamos que os *clusters* de EGF se localizam no RN em hASC e em SK-HEP-1 (figura 19), o que sugere a participação dessa organela no processo de translocação dessa proteína para o núcleo para ambos os tipos celulares. Também foram observados *clusters* de EGF no nucléolo de ambos os tipos celulares, o que sugere que o EGFR possa desempenhar alguma função associada a essa organela. Foi verificado anteriormente que receptores ERBB2 se localizam no nucléolo e apresentam funções na regulação da síntese de RNA ribossomais (LI et al., 2011), o que sustenta a hipótese de uma localização preferencial para o EGFR (receptor da mesma família) nessa organela. Pelas imagens analisadas, de modo geral, os *clusters* de EGF estão distribuídos por todo o nucleoplasma, não apenas nas organelas observadas (figura 19). Para verificar melhor a localização subnuclear dessa proteína e de seu receptor, seria necessário marcar outras organelas nucleares. A localização subnuclear do EGFR pode estar associada às suas funções já descritas no núcleo, como na replicação e reparo de DNA e na regulação da transcrição (LEE; WANG; HUNG, 2015), ou a novas funções associadas a essas organelas nucleares, como a produção e modificação de componentes da maquinaria de *splicing* (MAO; ZHANG; SPECTOR, 2011).

Tanto por MET (figuras 16 e 17) quanto por microscopia de superresolução (figura 18), verificamos, que as células SK-HEP-1 aparentam ter mais invaginações do que as hASC, o que está de acordo com evidências de que células tumorais apresentam maior quantidade de invaginações (JOHNSON et al., 2003). Além disso, as invaginações das células SK-HEP-1 parecem maiores do que as presentes em hASC, o que poderia estar relacionado ao fenótipo tumoral dessas células (SCHIRMER; DE LAS HERAS, 2014). Dado que as invaginações aumentam a área de membrana nuclear, invaginações mais profundas e em maior número permitiriam a presença de maior quantidade de *clusters* na membrana. Isso poderia explicar a

capacidade das células SK-HEP-1 de transportar maior volume de EGF para o núcleo com o aumento do tempo de estímulo (figura 12C) e, além disso, o maior volume total aparente de *clusters* de EGF no núcleo nessas células quando comparado às hASC em tempos prolongados de estímulo (figuras 9A e 13). Além do EGFR, o RN poderia estar relacionado à translocação para o núcleo de outros receptores, como o ERBB2, uma vez que este pode ser translocado para o núcleo por via de endomembranas (*INTERNET*) de acordo com Wang e colaboradores, em 2012.

A partir da diferença encontrada para a cinética de translocação de EGF para o núcleo entre hASC e SK-HEP-1, estabelecemos a hipótese de que ela também poderia ocorrer devido a possíveis diferenças no processo de translocação entre essas células, além de estar relacionada à produção diferencial do receptor. Além do modelo de translocação via *INTERNET* (WANG et al., 2012), há o modelo de Liao e colaboradores, no qual o EGFR é retrotranslocado da membrana do retículo endoplasmático para o citosol pelo translocon Sec61. No citosol, esse receptor se associa à Hsp70 para impedir formação de agregados e, por interação com importina β , passa pelo complexo do poro nuclear para o nucleoplasma (LIAO; CARPENTER, 2007). Em um estudo recente sobre o tráfego de vesículas com *Pseudomonas* endotoxina A (PE), Chaumet e colaboradores sugerem um novo mecanismo de translocação de receptores de membrana para o núcleo. Este seria dependente de estruturas que foram por eles denominadas endossomos associados ao envelope nuclear (NAE). Por essa hipótese, após endocitose dos receptores, os endossomos se dirigem diretamente ao envelope nuclear, num processo independente de Golgi. Foi observado que durante o trajeto os endossomos podem se fundir uns aos outros, formando estruturas com maior intensidade de fluorescência. Os NAE, então, seriam ancorados à membrana do envelope nuclear, de onde os receptores seriam translocados para o nucleoplasma, numa via dependente de Sec61 (CHAUMET et al., 2015). Para verificar se os mecanismos de translocação são diferentes entre as hASC e as SK-HEP-1, um estudo mais aprofundado, com marcação e silenciamento de moléculas importantes para os três modelos e acompanhamento dos efeitos gerados no acúmulo de EGFR no núcleo, seria necessário.

Em suma, este trabalho sugere que as diferenças na cinética de translocação do receptor para o núcleo entre as células mesenquimais analisadas podem estar relacionadas à produção diferencial do receptor e às funções nucleares relacionadas a processos oncogênicos que ele desempenha, as quais seriam importantes para as células tumorais analisadas. Além disso, sugerimos que o retículo nucleoplasmático tenha participação no mecanismo de translocação em ambos os tipos celulares, uma vez que alguns *clusters* estão localizados nessa organela. A localização subnuclear de

EGFR pode estar relacionada às funções desempenhadas pelo receptor no núcleo e pode estar associada a outros compartimentos nucleares específicos, assim como parece ocorrer para o retículo nucleoplasmático e o nucléolo, como verificado neste trabalho.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A translocação de EGF para o núcleo em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e em células tumorais SK-HEP-1 avaliada neste trabalho revelou alguns aspectos importantes relacionados às técnicas utilizadas. A microscopia de superresolução foi uma técnica robusta para a identificação dos *clusters* de EGF, a determinação da sua localização, a minimização de *background* de marcação e para a análise dos objetos marcados em reconstruções tridimensionais. A quantificação dos *clusters* por criação de uma imagem em 3 dimensões renderizada possibilitou avaliar a cinética de uma forma precisa, apesar de o método de ajuste dos parâmetros para a determinação dos *clusters* ter gerado presença de *clusters* em algumas hASC não-estimuladas.

Este estudo apresentou dados que contribuem para o entendimento da biologia do EGFR. A cinética de translocação de EGF para o núcleo diferiu entre os modelos celulares analisados, de forma que, enquanto para as hASC o equilíbrio de translocação parece ter sido alcançado com tempos mais curtos de exposição ao ligante, para as SK-HEP-1 a translocação continuou ocorrendo em tempos posteriores de estímulo. Ambos os modelos celulares analisados apresentam características mesenquimais, tendo as hASC perfil de células-tronco e a SK-HEP-1 perfil de célula-tronco tumoral. A diferença na cinética entre eles pode estar associada à maior produção de EGFR verificada para as SK-HEP-1 em comparação às hASC.

A aglomeração de EGF nuclear em tempos posteriores de estímulo para ambas as células sugerem que o receptor apresente localizações preferenciais no núcleo. A análise da localização subnuclear de EGF em imagens de microscopia de superresolução mostrou que os *clusters* estão presentes no retículo nucleoplasmático, o que sugere a participação dessa organela na translocação de EGFR no núcleo, uma vez que ela está associada ao envelope nuclear, envolvido no mecanismo de tráfego do receptor em um modelo proposto. Foram observados *clusters* de EGF também no nucléolo, o que sugere o desempenho de funções por parte do receptor nesse compartimento. Outros *clusters* estão distribuídos de forma difusa pelo nucleoplasma, e podem estar associados a outras organelas nucleares.

Como perspectiva, é preciso verificar de forma detalhada a cinética de translocação nos dois tipos celulares e outros mecanismos que possam estar relacionados a ela, como os envolvidos nos modelos de translocação estabelecidos. Além disso, analisar a localização subnuclear do EGF com a marcação de outras organelas nucleares seria importante para desvendar novas funções do seu receptor no núcleo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVRAHAM, R.; YARDEN, Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 2, p. 104-17, 2011.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 4, n. 7, p. 517-529, 2003.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell stem cell**, v. 2, n. 4, p. 313-9, 2008.

BOOTMAN, M. D.; FEARNLEY, C.; SMYRNIAS, I.; MACDONALD, F.; RODERICK, H. L. An update on nuclear calcium signalling. **J Cell Sci**, v. 122, n. 14, p. 2337-2350, 2009.

BOURGEOIS, C. A.; HEMON, D.; BOUTEILLE, M. Structural relationship between the nucleolus and the nuclear envelope. **Journal of ultrastructure research**, v. 68, n. 3, p. 328-40, 1979.

BOURIN, P.; BUNNELL, B. A.; CASTEILLA, L.; DOMINICI, M.; KATZ, A. J.; MARCH, K. L.; REDL, H.; RUBIN, J. P.; YOSHIMURA, K.; GIMBLE, J. M. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 641-648, 2013.

BOZLER, J.; NGUYEN, H. Q.; ROGERS, G. C.; BOSCO, G. Condensins exert force on chromatin-nuclear envelope tethers to mediate nucleoplasmic reticulum formation in *Drosophila melanogaster*. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 5, n. 3, p. 341-352, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAMPOS, A. C. D. A.; RODRIGUES, M. A.; DE ANDRADE, C.; DE GOES, A. M.; NATHANSON, M. H.; GOMES, D. A. Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 412, n. 2, p. 341-346, 2011.

CARLSON, R.; BEN-PORATH, E.; SHOUVAL, D.; STRAUSS, W.; ISSELBACHER, K.; WANDS, J. Antigenic characterization of human hepatocellular carcinoma. Development of in vitro and in vivo immunoassays that use monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 1, p. 40, 1985.

CARPENTER, G.; COHEN, S. 125I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. **The Journal of cell biology**, v. 71, n. 1, p. 159-171, 1976.

CHAUMET, A.; WRIGHT, G. D.; SEET, S. H.; THAM, K. M.; GOUNKO, N. V.; BARD, F. Nuclear envelope-associated endosomes deliver surface proteins to the nucleus. **Nature communications**, v. 6, 2015.

CHEN, Y.-J.; HUANG, W.-C.; WEI, Y.-L.; HSU, S.-C.; YUAN, P.; LIN, H. Y.; WISTUBA, I. I.; LEE, J. J.; YEN, C.-J.; SU, W.-C.; OTHERS. Elevated BCRP/ABCG2 expression confers acquired resistance to gefitinib in wild-type EGFR-expressing cells. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21428, 2011.

CHOU, R.-H.; WANG, Y.-N.; HSIEH, Y.-H.; LI, L.-Y.; XIA, W.; CHANG, W.-C.; CHANG, L.-C.; CHENG, C.-C.; LAI, C.-C.; HSU, J. L.; OTHERS. EGFR modulates DNA synthesis and repair through Tyr phosphorylation of histone H4. **Developmental cell**, v. 30, n. 2, p. 224-237, 2014.

CHOW, K.-H.; FACTOR, R. E.; ULLMAN, K. S. The nuclear envelope environment and its cancer connections. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 3, p. 196-209, 2012.

CITRI, A.; YARDEN, Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 7, n. 7, p. 505-516, 2006.

Clinical Trials. Disponível em: <www.clinicaltrials.gov>. Acesso em: 20 jan. 2017.

COHEN, M. H.; JOHNSON, J. R.; CHEN, Y.-F.; SRIDHARA, R.; PAZDUR, R. FDA drug approval summary: erlotinib (Tarceva\textregistered) tablets. **The oncologist**, v. 10, n. 7, p. 461-466, 2005.

COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 5, p. 1555-1562, 1962.

COHEN, S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). **Developmental biology**, v. 12, n. 3, p. 394-407, 1965.

COHEN, S. Epidermal growth factor. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 59, n. 1, p. 13-16, 1972.

COHEN, S.; CARPENTER, G. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 4, p. 1317-1321, 1975.

COHEN, S.; ELLIOTT, G. A. The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. **The Journal of investigative dermatology**, v. 40, p. 1-5, 1963.

COHEN, S.; FAVA, R. A.; SAWYER, S. T. Purification and characterization of epidermal growth factor receptor/protein kinase from normal mouse liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 20, p. 6237-6241, 1982.

COHEN, S.; USHIRO, H.; STOSCHECK, C.; CHINKERS, M. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 3, p. 1523-1531, 1982.

Colocalization analysis in aim and zen - a carl zeiss how-to guide.

DAVID, M.; WONG, L.; FLAVELL, R.; THOMPSON, S. A.; WELLS, A.; LARNER, A. C.; JOHNSON, G. R. STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 16, p. 9185-9188, 1996.

DAWSON, J. P.; BERGER, M. B.; LIN, C.-C.; SCHLESSINGER, J.; LEMMON, M. A.; FERGUSON, K. M. Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 17, p. 7734-7742, 2005.

DECHAT, T.; ADAM, S. A.; TAIMEN, P.; SHIMI, T.; GOLDMAN, R. D. Nuclear lamins. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 11, p. a000547, 2010.

DEMORY, M. L.; BOERNER, J. L.; DAVIDSON, R.; FAUST, W.; MIYAKE, T.; LEE, I.; HÜTTEMANN, M.; DOUGLAS, R.; HADDAD, G.; PARSONS, S. J. Epidermal Growth Factor Receptor Translocation to the Mitochondria REGULATION AND EFFECT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 52, p. 36592-36604, 2009.

DEY, P. Cancer nucleus: morphology and beyond. **Diagnostic cytopathology**, v. 38, n. 5, p. 382-90, 2010.

DI FIORE, F.; BLANCHARD, F.; CHARBONNIER, F.; LE PESSOT, F.; LAMY, A.; GALAIS, M.; BASTIT, L.; KILLIAN, A.; SESBOÛÉ, R.; TUECH, J.; OTHERS. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. **British journal of cancer**, v. 96, n. 8, p. 1166-1169, 2007.

DITTMANN, K.; MAYER, C.; FEHRENBACHER, B.; SCHALLER, M.; KEHLBACH, R.; RODEMANN, H. P. Nuclear epidermal growth factor receptor modulates cellular radio-sensitivity by regulation of chromatin access. **Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology**, v. 99, n. 3, p. 317-22, 2011.

DITTMANN, K.; MAYER, C.; FEHRENBACHER, B.; SCHALLER, M.; RAJU, U.; MILAS, L.; CHEN, D. J.; KEHLBACH, R.; RODEMANN, H. P. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 35, p. 31182-9, 2005.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria

for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DOWNWARD, J.; YARDEN, Y.; MAYES, E.; SCRACE, G.; TOTTY, N.; STOCKWELL, P. Close similarity of epidermal growth factor (T) receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. **Nature**, v. 307, p. 9, 1984.

DROZDZ, M. M.; VAUX, D. J. Shared mechanisms in physiological and pathological nucleoplasmic reticulum formation. **Nucleus**, n. just-accepted, p. 00-00, 2016.

DU, Y.; SHEN, J.; HSU, J.; HAN, Z.; HSU, M.; YANG, C.; KUO, H.; WANG, Y.; YAMAGUCHI, H.; MILLER, S.; OTHERS. Syntaxin 6-mediated Golgi translocation plays an important role in nuclear functions of EGFR through microtubule-dependent trafficking. **Oncogene**, v. 33, n. 6, p. 756-770, 2013.

DUNN, K. W.; KAMOCCA, M. M.; MCDONALD, J. H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 300, n. 4, p. C723-C742, 2011.

ECHEVARRÍA, W.; LEITE, M. F.; GUERRA, M. T.; ZIPFEL, W. R.; NATHANSON, M. H. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. **Nature cell biology**, v. 5, n. 5, p. 440-6, 2003.

ENGELMAN, J. A.; ZEJNULLAHU, K.; MITSUDOMI, T.; SONG, Y.; HYLAND, C.; PARK, J. O.; LINDEMAN, N.; GALE, C.-M.; ZHAO, X.; CHRISTENSEN, J.; OTHERS. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. **science**, v. 316, n. 5827, p. 1039-1043, 2007.

EUN, J. R.; JUNG, Y. J.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; TSCHUDY-SENEY, B.; RAMSAMOOJ, R.; WAN, Y.-J. Y.; THEISE, N. D.; ZERN, M. A.; DUAN, Y. Hepatoma SK Hep-1 cells exhibit characteristics of oncogenic mesenchymal stem cells with highly metastatic capacity. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110744, 2014.

FARIA, J. A.; DE ANDRADE, C.; GOES, A. M.; RODRIGUES, M. A.; GOMES, D. A. Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 478, n. 1, p. 39-45, 2016.

FRICKER, M.; HOLLINSHEAD, M.; WHITE, N.; VAUX, D. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. **The Journal of cell biology**, v. 136, n. 3, p. 531-544, 1997.

GOMES, D. A.; RODRIGUES, M. A.; LEITE, M. F.; GOMEZ, M. V.; VARNAI, P.; BALLA, T.; BENNETT, A. M.; NATHANSON, M. H. c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 7, p. 4344-4351, 2008.

GORDEN, P.; CARPENTIER, J.-L.; COHEN, S.; ORCI, L. Epidermal growth factor: morphological demonstration of binding, internalization, and lysosomal association in human fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n. 10, p. 5025-5029, 1978.

HADZISEJDIĆ, I.; MUSTAĆ, E.; JONJIĆ, N.; PETKOVIĆ, M.; GRAHOVAC, B. Nuclear EGFR in ductal invasive breast cancer: correlation with cyclin-D1 and prognosis. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 23, n. 3, p. 392-403, 2010.

HAIGLER, H. T.; MCKANNA, J. A.; COHEN, S. Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. **The Journal of Cell Biology**, v. 81, n. 2, p. 382-395, 1979.

HAN, W.; CARPENTER, R. L.; CAO, X.; LO, H.-W. STAT1 gene expression is enhanced by nuclear EGFR and HER2 via cooperation with STAT3. **Molecular carcinogenesis**, v. 52, n. 12, p. 959-69, 2013.

HAN, W.; DU, Y. Recent Development of the Second and Third Generation Irreversible EGFR Inhibitors. **Chemistry & Biodiversity**, 2017.

HAN, W.; LO, H.-W. Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. **Cancer letters**, v. 318, n. 2, p. 124-134, 2012.

HARRIS, R. C.; CHUNG, E.; COFFEY, R. J. EGF receptor ligands. **Experimental cell research**, v. 284, n. 1, p. 2-13, 2003.

HEFFELFINGER, S. C.; HAWKINS, H. H.; BARRISH, J.; TAYLOR, L.; DARLINGTON, G. J. SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 28, n. 2, p. 136-142, 1992.

HENDLER, F.; OZANNE, B. Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. **Journal of clinical investigation**, v. 74, n. 2, p. 647, 1984.

HOSHINO, M.; FUKUI, H.; ONO, Y.; SEKIKAWA, A.; ICHIKAWA, K.; TOMITA, S.; IMAI, Y.; IMURA, J.; HIRAIISHI, H.; FUJIMORI, T. Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, v. 74, n. 1, p. 15-21, 2007.

HSU, S.-C.; HUNG, M.-C. Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 14, p. 10432-10440, 2007.

HUANG, W.-C.; CHEN, Y.-J.; LI, L.-Y.; WEI, Y.-L.; HSU, S.-C.; TSAI, S.-L.; CHIU, P.-C.; HUANG, W.-P.; WANG, Y.-N.; CHEN, C.-H.; OTHERS. Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 23, p. 20558-20568, 2011.

HUNG, L.-Y.; TSENG, J. T.; LEE, Y.-C.; XIA, W.; WANG, Y.-N.; WU, M.-L.; CHUANG, Y.-H.; LAI, C.-H.; CHANG, W.-C. Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 13, p. 4337-4351, 2008.

HUNTER, T.; COOPER, J. A. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. **Cell**, v. 24, n. 3, p. 741-52, 1981.

IIDA, M.; BRAND, T. M.; CAMPBELL, D. A.; LI, C.; WHEELER, D. L. Yes and Lyn play a role in nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor. **Oncogene**, v. 32, n. 6, p. 759-767, 2013a.

IIDA, M.; BRAND, T. M.; STARR, M. M.; LI, C.; HUPPERT, E. J.; LUTHAR, N.; PEDERSEN, M. W.; HORAK, I. D.; KRAGH, M.; WHEELER, D. L. Sym004, a novel EGFR antibody mixture, can overcome acquired resistance to cetuximab. **Neoplasia**, v. 15, n. 10, p. 1196-1206, 2013b.

JOHNSON, N.; KREBS, M.; BOUDREAU, R.; GIORGI, G.; LEGROS, M.; LARABELL, C. Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation. **Differentiation**, v. 71, n. 7, p. 414-424, 2003.

KIM, H.-P.; YOON, Y.-K.; KIM, J.-W.; HAN, S.-W.; HUR, H.-S.; PARK, J.; LEE, J.-H.; OH, D.-Y.; IM, S.-A.; BANG, Y.-J.; OTHERS. Lapatinib, a dual EGFR and HER2 tyrosine kinase inhibitor, downregulates thymidylate synthase by inhibiting the nuclear translocation of EGFR and HER2. **PloS one**, v. 4, n. 6, p. e5933, 2009.

LEE, H.-H.; WANG, Y.-N.; HUNG, M.-C. Non-canonical signaling mode of the epidermal growth factor receptor family. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 10, p. 2944, 2015.

LEE, H.-J.; LAN, L.; PENG, G.; CHANG, W.-C.; HSU, M.-C.; WANG, Y.-N.; CHENG, C.-C.; WEI, L.; NAKAJIMA, S.; CHANG, S.-S.; OTHERS. Tyrosine 370 phosphorylation of ATM positively regulates DNA damage response. **Cell research**, v. 25, n. 2, p. 225-236, 2015.

LEGARTOVÁ, S.; STIXOVÁ, L.; LAUR, O.; KOZUBEK, S.; SEHNALOVÁ, P.; BÁRTOVÁ, E. Nuclear structures surrounding internal lamin invaginations. **Journal of cellular biochemistry**, v. 115, n. 3, p. 476-87, 2014.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J.; FERGUSON, K. M. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 4, p. a020768, 2014.

LI, C.-F.; FANG, F.-M.; WANG, J.-M.; TZENG, C.-C.; TAI, H.-C.; WEI, Y.-C.; LI, S.-H.; LEE, Y.-T.; WANG, Y.-H.; YU, S.-C.; OTHERS. EGFR nuclear import in gallbladder carcinoma: nuclear phosphorylated EGFR upregulates iNOS expression and confers independent prognostic impact. **Annals of surgical oncology**, v. 19, n. 2, p. 443-454, 2012.

LI, L.-Y.; CHEN, H.; HSIEH, Y.-H.; WANG, Y.-N.; CHU, H.-J.; CHEN, Y.-H.; CHEN, H.-Y.; CHIEN, P.-J.; MA, H.-T.; TSAI, H.-C.; LAI, C.-C.; SHER, Y.-P.; LIEN, H.-C.; TSAI, C.-H.; HUNG, M.-C. Nuclear ErbB2 enhances translation and cell growth by activating transcription of ribosomal RNA genes. **Cancer research**, v. 71, n. 12, p. 4269-79, 2011.

LI, X.; WU, C.; CHEN, N.; GU, H.; YEN, A.; CAO, L.; WANG, E.; WANG, L. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. **Oncotarget**, 2016.

LIAO, H.-J.; CARPENTER, G. Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 3, p. 1064-1072, 2007.

LIBERMANN, T. A.; NUSBAUM, H. R.; RAZON, N.; KRIS, R.; LAX, I.; SOREQ, H.; WHITTLE, N.; WATERFIELD, M. D.; ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. **Nature**, v. 313, n. 5998, p. 144-147, 1985.

LIBERMANN, T.; RAZON, N.; BARTAL, A.; YARDEN, Y.; SCHLESSINGER, J.; SOREQ, H. Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. **Cancer research**, v. 44, n. 2, p. 753-760, 1984.

LICCARDI, G.; HARTLEY, J. A.; HOCHHAUSER, D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. **Cancer research**, v. 71, n. 3, p. 1103-14, 2011.

LIN, S.-Y.; MAKINO, K.; XIA, W.; MATIN, A.; WEN, Y.; KWONG, K. Y.; BOURGUIGNON, L.; HUNG, M.-C. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. **Nature cell biology**, v. 3, n. 9, p. 802-808, 2001.

LO, H.; HUNG, M. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. **British journal of cancer**, v. 94, n. 2, p. 184-188, 2006.

LO, H.-W.; ALI-SEYED, M.; WU, Y.; BARTHOLOMEUSZ, G.; HSU, S.-C.; HUNG, M.-C. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. **Journal of cellular biochemistry**, v. 98, n. 6, p. 1570-83, 2006.

LO, H.-W.; CAO, X.; ZHU, H.; ALI-OSMAN, F. Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. **Molecular Cancer Research**, v. 8, n. 2, p. 232-245, 2010.

LO, H.-W.; HSU, S.-C.; ALI-SEYED, M.; GUNDUZ, M.; XIA, W.; WEI, Y.; BARTHOLOMEUSZ, G.; SHIH, J.-Y.; HUNG, M.-C. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. **Cancer cell**, v. 7, n. 6, p. 575-589, 2005a.

LO, H.-W.; HSU, S.-C.; HUNG, M.-C. EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocalization. **Breast cancer research and treatment**, v. 95, n. 3, p. 211-218, 2006.

LO, H.-W.; XIA, W.; WEI, Y.; ALI-SEYED, M.; HUANG, S.-F.; HUNG, M.-C. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 1, p. 338-48, 2005b.

LYNCH, T. J.; BELL, D. W.; SORDELLA, R.; GURUBHAGAVATULA, S.; OKIMOTO, R. A.; BRANNIGAN, B. W.; HARRIS, P. L.; HASERLAT, S. M.; SUPKO, J. G.; HALUSKA, F. G.; OTHERS. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 21, p. 2129-2139, 2004.

MALHAS, A.; GOULBOURNE, C.; VAUX, D. J. The nucleoplasmic reticulum: form and function. **Trends in cell biology**, v. 21, n. 6, p. 362-73, 2011.

MAO, Y. S.; ZHANG, B.; SPECTOR, D. L. Biogenesis and function of nuclear bodies. **Trends in Genetics**, v. 27, n. 8, p. 295-306, 2011.

MARGOLIS, B.; LI, N.; KOCH, A.; MOHAMMADI, M.; HURWITZ, D.; ZILBERSTEIN, A.; ULLRICH, A.; PAWSON, T.; SCHLESSINGER, J. The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. **The EMBO journal**, v. 9, n. 13, p. 4375, 1990.

MCKAY, M. M.; MORRISON, D. K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3113-21, 2007.

MONTAGUT, C.; DALMASES, A.; BELLOSILLO, B.; CRESPO, M.; PAIRET, S.; IGLESIAS, M.; SALIDO, M.; GALLEN, M.; MARSTERS, S.; TSAI, S. P.; OTHERS. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. **Nature medicine**, v. 18, n. 2, p. 221-223, 2012.

NYATI, M. K.; MORGAN, M. A.; FENG, F. Y.; LAWRENCE, T. S. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 11, p. 876-885, 2006.

PAEZ, J. G.; JÄNNE, P. A.; LEE, J. C.; TRACY, S.; GREULICH, H.; GABRIEL, S.; HERMAN, P.; KAYE, F. J.; LINDEMAN, N.; BOGGON, T. J.; OTHERS. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. **Science**, v. 304, n. 5676, p. 1497-1500, 2004.

PAO, W.; MILLER, V. A.; POLITI, K. A.; RIELY, G. J.; SOMWAR, R.; ZAKOWSKI, M. F.; KRIS, M. G.; VARMUS, H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. **PLoS medicine**, v. 2, n. 3, p. e73, 2005.

PAO, W.; MILLER, V.; ZAKOWSKI, M.; DOHERTY, J.; POLITI, K.; SARKARIA, I.; SINGH, B.; HEELAN, R.; RUSCH, V.; FULTON, L.; OTHERS. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 36, p. 13306-13311, 2004.

PATTERSON, R. L.; VAN ROSSUM, D. B.; NIKOLAIDIS, N.; GILL, D. L.; SNYDER, S. H. Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. **Trends in biochemical sciences**, v. 30, n. 12, p. 688-97, 2005.

PENG, D.; FAN, Z.; LU, Y.; DEBLASIO, T.; SCHER, H.; MENDELSON, J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. **Cancer research**, v. 56, n. 16, p. 3666-3669, 1996.

PEREIRA, N. B.; DO CARMO, A. C. de M.; DINIZ, M. G.; GOMEZ, R. S.; GOMES, D. A.; GOMES, C. C. Nuclear localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in ameloblastomas. **Oncotarget**, v. 6, n. 12, p. 9679, 2015.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PRUNUSKE, A. J.; ULLMAN, K. S. The nuclear envelope: form and reformation. **Current opinion in cell biology**, v. 18, n. 1, p. 108-16, 2006.

PSYRRI, A.; YU, Z.; WEINBERGER, P. M.; SASAKI, C.; HAFFTY, B.; CAMP, R.; RIMM, D.; BURTNESS, B. A. Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 16, p. 5856-5862, 2005.

QUESNELLE, K. M.; BOEHM, A. L.; GRANDIS, J. R. STAT-mediated EGFR signaling in cancer. **Journal of cellular biochemistry**, v. 102, n. 2, p. 311-9, 2007.

RODRIGUES, M. A.; GAMBA, C. O.; FARIA, J. A. Q. A.; FERREIRA, Ê.; GOES, A. M.; GOMES, D. A.; CASSALI, G. D. Inner nuclear membrane localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in spontaneous canine model of invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland. **Pathology-Research and Practice**, v. 212, n. 4, p. 340-344, 2016.

RODRIGUES, M. A.; GOMES, D. A.; ANDRADE, V. A.; LEITE, M. F.; NATHANSON, M. H. Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 1621-1631, 2008.

RODRIGUES, M. A.; GOMES, D. A.; LEITE, M. F.; GRANT, W.; ZHANG, L.; LAM, W.; CHENG, Y.-C.; BENNETT, A. M.; NATHANSON, M. H. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 23, p. 17061-17068, 2007.

ROSKOSKI, R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 79, p. 34-74, 2014.

ROTIN, D.; HONEGGER, A.; MARGOLIS, B.; ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Presence of SH2 domains of phospholipase C gamma 1 enhances substrate phosphorylation by increasing the affinity toward the epidermal growth factor receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 9678-9683, 1992.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098-1101, 2005.

SAVAGE, C. R.; INAGAMI, T.; COHEN, S. The primary structure of epidermal growth factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 247, n. 23, p. 7612-21, 1972.

SCHER, C.; TODARO, G. Selective growth of human neoplastic cells in medium lacking serum growth factor. **Experimental cell research**, v. 68, n. 2, p. 479-481, 1971.

SCHIRMER, E. C.; DE LAS HERAS, J. I. **Cancer biology and the nuclear envelope**. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2014.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 211-225, 2000.

SCHULZE, W. X.; DENG, L.; MANN, M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. **Molecular systems biology**, v. 1, p. 2005.0008, 2005.

SHAMBLOTT, M. J.; AXELMAN, J.; WANG, S.; BUGG, E. M.; LITTLEFIELD, J. W.; DONOVAN, P. J.; BLUMENTHAL, P. D.; HUGGINS, G. R.; GEARHART, J. D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 23, p. 13726-31, 1998.

SIBILIA, M.; KROISMAYR, R.; LICHTENBERGER, B. M.; NATARAJAN, A.; HECKING, M.; HOLCMANN, M. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. **Differentiation**, v. 75, n. 9, p. 770-787, 2007.

SORKIN, A.; VON ZASTROW, M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 10, n. 9, p. 609-622, 2009.

SPORN, M. B.; TODARO, G. J. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. 1980.

STOSCHECK, C. M.; KING, L. E. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. **Cancer research**, v. 46, n. 3, p. 1030-1037, 1986.

SUNDELL, H. W.; GRAY, M. E.; SERENIUS, F. S.; ESCOBEDO, M. B.; STAHLMAN, M. T. Effects of epidermal growth factor on lung maturation in fetal lambs. **The American journal of pathology**, v. 100, n. 3, p. 707-26, 1980.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TRAYNOR, A. M.; WEIGEL, T. L.; OETTEL, K. R.; YANG, D. T.; ZHANG, C.; KIM, K.; SALGIA, R.; IIDA, M.; BRAND, T. M.; HOANG, T.; CAMPBELL, T. C.; HERNAN, H. R.; WHEELER, D. L. Nuclear EGFR protein expression predicts poor survival in early stage non-small cell lung cancer. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 81, n. 1, p. 138-41, 2013.

TURKINGTON, R. The role of epithelial growth factor in mammary gland development in vitro. **Experimental cell research**, v. 57, n. 1, p. 79-85, 1969a.

TURKINGTON, R. W. Stimulation of mammary carcinoma cell proliferation by epithelial growth factor in vitro. **Cancer research**, v. 29, n. 7, p. 1457-1458, 1969b.

TURNER, B. M.; TURNER, V. S. Secretion of alpha 1-antitrypsin by an established human hepatoma cell line and by human/mouse hybrids. **Somatic cell genetics**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 1980.

ULLRICH, A.; COUSSENS, L.; HAYFLICK, J. S.; DULL, T. J.; GRAY, A.; TAM, A.; LEE, J.; YARDEN, Y.; LIBERMANN, T. A.; SCHLESSINGER, J. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. **Nature**, v. 309, n. 5967, p. 418-425, 1984.

USHIRO, H.; COHEN, S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 18, p. 8363-8365, 1980.

WANG, S.-C.; NAKAJIMA, Y.; YU, Y.-L.; XIA, W.; CHEN, C.-T.; YANG, C.-C.; MCINTUSH, E. W.; LI, L.-Y.; HAWKE, D. H.; KOBAYASHI, R.; HUNG, M.-C. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. **Nature cell biology**, v. 8, n. 12, p. 1359-68, 2006.

WANG, Y.-N.; HUNG, M.-C. Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. **Cell & bioscience**, v. 2, n. 1, p. 1, 2012.

WANG, Y.-N.; LEE, H.-H.; LEE, H.-J.; DU, Y.; YAMAGUCHI, H.; HUNG, M.-C. Membrane-bound trafficking regulates nuclear transport of integral epidermal growth factor receptor (EGFR) and ErbB-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 20, p. 16869-16879, 2012.

WANG, Y.-N.; WANG, H.; YAMAGUCHI, H.; LEE, H.-J.; LEE, H.-H.; HUNG, M.-C. COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 399, n. 4, p. 498-504, 2010a.

WANG, Y.-N.; YAMAGUCHI, H.; HUO, L.; DU, Y.; LEE, H.-J.; LEE, H.-H.; WANG, H.; HSU, J.-M.; HUNG, M.-C. The translocon Sec61 β localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 49, p. 38720-38729, 2010b.

WEISSHART, K. The basic principle of airyscanning. **Zeiss Technology Note**, p. 22, 2014.

WILSON, K. L.; BERK, J. M. The nuclear envelope at a glance. **J Cell Sci**, v. 123, n. 12, p. 1973-1978, 2010.

XIA, W.; MULLIN, R. J.; KEITH, B. R.; LEI-HUA, L.; MA, H.; RUSNAK, D. W.; OWENS, G.; ALLIGOOD, K. J.; SPECTOR, N. L. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. **Oncogene**, v. 21, n. 41, p. 6255, 2002.

XIA, W.; WEI, Y.; DU, Y.; LIU, J.; CHANG, B.; YU, Y.-L.; HUO, L.-F.; MILLER, S.; HUNG, M.-C. Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. **Molecular carcinogenesis**, v. 48, n. 7, p. 610-7, 2009.

XU, Y.; SHAO, Y.; ZHOU, J.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Ultraviolet irradiation-induces epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation in human keratinocytes. **Journal of cellular biochemistry**, v. 107, n. 5, p. 873-880, 2009.

YARDEN, Y.; PINES, G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 8, p. 553-63, 2012.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 2, n. 2, p. 127-137, 2001.

YONESAKA, K.; ZEJNULLAHU, K.; OKAMOTO, I.; SATOH, T.; CAPPUZZO, F.; SOUGLAKOS, J.; ERCAN, D.; ROGERS, A.; RONCALLI, M.; TAKEDA, M.; FUJISAKA, Y.; PHILIPS, J.; SHIMIZU, T.; MAENISHI, O.; CHO, Y.; SUN, J.; DESTRO, A.; TAIRA, K.; TAKEDA, K.; OKABE, T.; SWANSON, J.; ITOH, H.; TAKADA, M.; LIFSHITS, E.; OKUNO, K.; ENGELMAN, J. A.; SHIVDASANI, R. A.; NISHIO, K.; FUKUOKA, M.; VARELLA-GARCIA, M.; NAKAGAWA, K.; JÄNNE, P. A. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. **Science translational medicine**, v. 3, n. 99, p. 99ra86, 2011.

ZHANG, X.; GUREASKO, J.; SHEN, K.; COLE, P. A.; KURIYAN, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. **Cell**, v. 125, n. 6, p. 1137-1149, 2006.

ZIDOVETZKI, R.; YARDEN, Y.; SCHLESSINGER, J.; JOVIN, T. M. Rotational diffusion of epidermal growth factor complexed to cell surface receptors reflects rapid microaggregation and endocytosis of occupied receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 11, p. 6981-6985, 1981.

ZUK, P. Adipose-derived stem cells in tissue regeneration: a review. **ISRN Stem Cells**, v. 2013, 2013.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, 2002.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

9. ANEXOS

9.1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

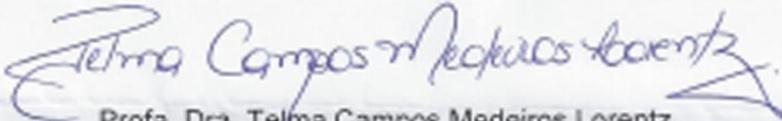
Projeto: CAAE 55698116.2.0000.5149

Interessado(a): Prof. Alfredo Miranda de Goes
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 18 de maio de 2016, o projeto de pesquisa intitulado **"Modelo substituto de pele humana a partir de princípios da engenharia de tecidos visando a regeneração de lesões e utilização em testes toxicológicos in vitro"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.



Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

Av. Prez. Antonio Carlos, 6527 – Unidade Administrativa II - 2º andar – Sala 2065 – Cep:31270-901 – BH-MG
Telef: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@ppq.ufmg.br

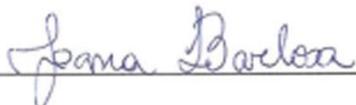
9.2 – Termo de doação de material humano para pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Termo de doação de material humano para pesquisa científica

Eu, Joana Lobato Barbosa, RG: MG-13.966.344, CPF nº 012332266-90, declaro, para os devidos fins, que doe amostras de tecido adiposo subcutâneo humano destinado ao meu projeto de pesquisa intitulado "Modelo substituto de pele humana a partir de princípios da engenharia de tecidos visando a regeneração de lesões e utilização em testes toxicológicos", número COEP: 55698116.2.0000.5149, para o projeto de mestrado de Camila Cristina Fraga Faraco, RG: MG-15.967.779, CPF nº 099137566-18, intitulado "Estudo da cinética da translocação do fator de crescimento epidermal (EGF) para o núcleo e da sua localização subnuclear em células-tronco mesenquimais e em células tumorais da linhagem SK-HEP-1".

Belo Horizonte, 25 de janeiro de 2017.



Joana Lobato Barbosa