

Ana Carolina De Angelis Campos

**BALSAS LIPÍDICAS SÃO NECESSÁRIAS PARA A
TRANSLOCAÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE
CRESCIMENTO EPIDERMAL PARA O NÚCLEO**

**Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais**

Belo Horizonte

2010

Ana Carolina De Angelis Campos

**BALSAS LIPÍDICAS SÃO NECESSÁRIAS PARA A
TRANSLOCAÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE
CRESCIMENTO EPIDERMAL PARA O NÚCLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes

Co-orientador: Prof. Dr. Jader Santos Cruz

**Belo Horizonte - MG
2010**

“O conhecimento, quando está subordinado ao coração, se transforma em sabedoria e discernimento.”

Rachel H. Salles

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

Agradecimentos

Agradeço a Deus e a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, prof. Dawidson Gomes, que através de muitos ensinamentos proporcionou meu crescimento científico, profissional e pessoal. Obrigada por toda paciência, boa vontade, dedicação, incentivo e pelas valiosas oportunidades de conhecimento e crescimento.

Ao meu co-orientador, prof. Jader Cruz, que desde a iniciação científica acreditou no meu esforço, me apoiou e incentivou. Agradeço pelas oportunidades e pelos fundamentais conselhos e ensinamentos.

À Michele Rodrigues, pela imensa ajuda nos experimentos, por ter tido paciência de me ensinar tantas coisas e por estar sempre disposta a esclarecer minhas dúvidas e ajudar a resolver “problemas experimentais”. Obrigada pela acolhida nos EUA e, acima de tudo, pela amizade.

Ao prof. Alfredo Goes, pelo suporte essencial nos experimentos e por ser sempre tão gentil e atencioso.

Aos queridos colegas do laboratório: Carol Andrade, Bruno Leles, Cláudia, Jerusa e Carol Melo, por sempre estarem dispostos para uma ajudinha nos experimentos, pela amizade e por fazerem do nosso lab um lugar agradável de trabalhar. Em especial, agradeço a Carol Andrade, que me acompanhou em grande parte dos experimentos, com o dom de me animar nos momentos de desânimo, sendo um apoio muito importante na realização desse trabalho.

A todas as meninas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, por terem me recebido tão bem no lab, por toda atenção e carinho e por estarem sempre dispostas a ajudar.

À minha família. Primeiramente, agradeço aos meus amados pais, Ana Lucia e Marco Antonio, pelo amor, incentivo, pelo exemplo e por permitirem que meus sonhos se tornassem realidade. Ao meu irmão Lucas, pelo apoio e amizade. Aos meus avós pela oração. A todos que sempre torceram por mim.

Agradecimentos

Às queridas amigas Lili Mendes, Carol Gioda e Tatiane, pelos momentos de descontração, por todo apoio e incentivo e, acima de tudo, pela grande amizade.

À amiga Carol Reis, minha dupla mais dupla do ICB, pela amizade, companheirismo e pelo incentivo sempre positivo.

Aos colegas do Lab. de Membranas Excitáveis e Biologia Cardiovascular, inclusive os que não estão mais no laboratório (Eva, Diogo, Thales, Hugo), pelo carinho e amizade.

Ao meu anjo, Daniel, pelo amor, amizade, incentivo, confiança e pela paciência e compreensão nos momentos críticos.

À turma de Bases, que tornaram essa caminhada mais agradável e animada. Agradeço, em especial, à amiga Marcela Segatto pelas longas conversas e conselhos.

Ao Dr. Michael H. Nathanson pela colaboração e oportunidade do estágio em seu laboratório.

A todos os professores e funcionários do departamento de Bioquímica e Imunologia.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1. Introdução	1
1.1. O receptor do fator de crescimento epidermal	2
1.2. Internalização e localização nuclear do EGFR	10
1.3. Endocitose: porta de entrada nas células	15
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. Materiais e Métodos	22
3.1. Cultura celular	23
3.1.1 <i>SKHep-1</i>	23
3.1.2 <i>MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB 231</i>	23
3.1.3 <i>Hepatócitos primários</i>	23
3.2. Estimulo com fator de crescimento epidermal.....	23
3.3. Transfecção com pequenos RNAs de interferência (siRNA).....	24
3.4. Transfecção com plasmídeos	25
3.5. Tratamento com metil- β -ciclodextrina.....	25
3.6. Extração de proteínas totais e fracionamento celular	25

3.7. Western blot	26
3.8. Imunofluorescência	27
4. Resultados	28
4.1. As células SKHep-1 expressam EGFR e são responsivas ao EGF	29
4.2. O EGFR transloca para o núcleo em células SKHep-1	31
4.3. O EGFR transloca para o núcleo em hepatócitos primários.....	35
4.4. A dinamina K44A bloqueia a translocação do EGFR para o núcleo	36
4.5. O <i>knockdown</i> de clatrina não bloqueia a translocação do EGFR para o núcleo.....	37
4.6. O tratamento com metil- β -ciclodextrina diminui a translocação de EGFR para o núcleo	38
4.7. O <i>knockdown</i> de caveolina inibe a translocação de EGFR para o núcleo	40
4.8. A maior parte do EGFR que é internalizado em resposta ao EGF não vai para lisossomos.....	43
5. Discussão e Conclusões	44
6. Referências bibliográficas	52

Lista de Abreviaturas

μg		Micrograma
μl		Microlitro
3D		Tridimensional
ARF6	ADP-ribosylation factor 6	Fator 6 de ribosilação do ADP
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosina trifosfato
CAV-1	Caveolin 1	Caveolina 1
CDC42	Cell division control protein 42	Proteína 42 de controle do ciclo celular
CHC2	Clathrin heavy chain 2	Cadeia pesada 2 da clatrina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Meio modificado de Dulbecco
EGF	Epidermal growth factor	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Receptor do fator de crescimento epidermal
Erk	Extracellular signal-regulated kinases	Cinase regulada por sinal extracelular
GFP	Green fluorescent protein	Proteína fluorescente verde
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosina trifosfato
InsP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate	Inositol 1,4,5-trifosfato

kDa		Kilo Dalton
mAb	Monoclonal anti-body	Anticorpo monoclonal
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Cinase ativada por mitógenos
mL		Mililitro
mM		Milimolar
M β CD	Methyl-beta-cyclodextrin	Metil-beta-ciclodextrina
NaCl		Cloreto de sódio
nEGFR	Nuclear epideramal growth factor receptor	Receptor do fator de crescimento epidermal nuclear
ng		Nanograma
nM		Nanomolar
PBS	Phosphate-buffered saline	Solução salina tamponada com fosfato
pEGFR	Phosphorylated epidermal growth factor receptor	Receptor do fator de crescimento epidermal fosforilado
pErk 1/2	Phosphorilated extracellular signal-regulated kinases 1 and 2	Cinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 fosforiladas
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase	Fosfatidilinositol-3-cinase
PLC γ	Phospholipase C γ	Fosfolipase C γ
PLD	Phospholipase D	Fosfolipase D
PTB	Phosphotyrosine binding domain	Domínio de ligação à fosfotirosinas
RNA	Ribonucleic acid	Acido ribonucleico
RTK	Receptor tyrosine kinase	Receptor tirosina cinase

SH2	Src-homology 2 domain	Domínio de homologia a Src 2
<hr/>		
SHP-1	Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1	Fosfatase 1 com região de homologia a Src
<hr/>		
siRNA	Small interfering RNA	Pequenos RNAs de interferência
<hr/>		
Sos	Son of sevenless homolog	Homólogo de <i>son of sevenless</i>
<hr/>		
Src	Sarcoma	Sarcoma
<hr/>		
STAT	Signal transducer and activator of transcription	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
<hr/>		
TBS	Tris-buffered saline	Solução salina tamponada com tris

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura do EGFR.....	3
Figura 2. Sinalização clássica via EGFR.....	6
Figura 3. Função da dinamina.....	17
Figura 4. Células SKHep-1 expressam EGFR.....	29
Figura 5. Os níveis de pErk 1/2 aumentam com o tempo de estímulo com EGF em células SKHep-1.....	30
Figura 6. Os níveis de pErk 1/2 aumentam em células SKHep-1 estimuladas com concentrações crescentes de EGF.....	30
Figura 7. Co-localização de EGF e EGFR no núcleo de células SKHep-1.....	32
Figura 8. O EGFR é localizado no interior do núcleo de células estimuladas com EGF.....	33
Figura 9. O EGFR é translocado para o núcleo de células SKHep-1.....	34
Figura 10. O EGFR transloca para o núcleo em hepatócitos estimulados com EGF.....	35
Figura 11. A expressão de dinamina K44A bloqueia a translocação do EGFR para o núcleo.....	36
Figura 12. O siRNA para CHC2 reduz a expressão de CHC2.....	37
Figura 13. O <i>knockdown</i> de CHC2 não bloqueia a translocação do EGFR para o núcleo.....	38
Figura 14. O tratamento com M β CD reduz a translocação do EGFR para o núcleo.....	39
Figura 15. EGF não é detectado no núcleo de células tratadas com M β CD...	40
Figura 16. O siRNA para CAV-1 reduz a expressão de CAV-1.....	41
Figura 17. A translocação do EGFR para o núcleo é inibida em células transfectadas com CAV-1 siRNA.....	42

Figura 18. O <i>knockdown</i> de CAV-1 inibe a translocação do EGFR para o núcleo.....	42
Figura 19. A maior parte do EGF não co-localiza com lisossomos em SKHep-1.....	43

Lista de Tabelas

Tabela 1. Proteínas sinalizadoras que são diretamente associadas ao EGFR, suas funções e sítios de ligação preferidos no EGFR.....	5
Tabela 2. Funções biológicas do EGFR nuclear.....	12

Resumo

O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) regula processos celulares de ligantes como o EGF e fator de crescimento transformante alfa (TGF- α). Sua ativação inicia cascatas de sinalização que podem resultar em proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular. O EGFR é internalizado após ativação e, inicialmente, pensava-se que este era um mecanismo de regulação negativa da sinalização. Recentemente ficou evidenciado que esse receptor pode translocar para o núcleo após estímulo com ligantes, onde atua como fator de transcrição e transdutor de sinal. A expressão anormal e/ou mutações do EGFR estão implicadas na progressão de tumores sólidos de origem epitelial e seu bloqueio por anticorpos monoclonais (mAbs) é um alvo importante na terapia contra o câncer. No entanto, dados recentes apontaram que o EGFR nuclear (nEGFR) está envolvido na resistência adquirida ao tratamento com mAbs e essa localização do receptor representa maior valor prognóstico para pacientes com certos tipos de tumores. Apesar da importância do nEGFR ter sido demonstrada, o mecanismo pelo qual o receptor é internalizado e chega ao núcleo não está esclarecido. Assim, o presente trabalho tem como objetivo identificar a via endocítica que medeia a translocação do EGFR para o núcleo. Foram utilizadas células endoteliais de tumor hepático humano SKHep-1, as quais expressam altos níveis de EGFR. Nestas células a internalização e a translocação para o núcleo foi avaliada por western blot e EGF marcado com Alexa 488 ou 555. Assim foi demonstrado que o EGFR transloca para o núcleo com um pico de translocação entre 5-10 minutos de estímulo com EGF. O papel da dinamina nesse processo foi avaliado através do uso do dominante negativo K44A. Empregando a técnica de siRNA, avaliou-se a dependência de clatrina e caveolina na endocitose do EGFR. A comprovação da dependência de balsas lipídicas nesse processo foi realizada com a utilização de metil-beta-ciclodextrina (M β CD). Como resultado, identificou-se que a translocação do EGFR para o núcleo é dependente de dinamina e caveolas/balsas lipídicas. Além disso, foi demonstrado que a translocação nuclear do EGFR não depende de endocitose mediada por clatrina.

Abstract

The epidermal growth factor receptor (EGFR) regulates cellular process of ligands such as EGF and transforming growth factor alpha (TGF- α). Upon activation EGFR initiates signaling cascades that can result in cell proliferation, differentiation, migration and survival. Recently it was shown that EGFR can be translocated to the nucleus after ligand stimulation, where it acts as a transcription factor and signal transducer. Abnormal expression and/or mutations of EGFR are implicated in the progression of epithelial-derived solid tumors and its block by monoclonal antibodies (mAbs) is an important target for cancer therapy. However, recent data point that nuclear EGFR (nEGFR) is involved in acquired resistance to mAbs and this localization of the receptor represent a major prognostic value for patients with some kind of tumors. Regardless of the nEGFR importance has been demonstrated, the mechanisms by which this receptor is translocated to the nucleus is not clear. Thus, the present study aimed to identify the endocytic pathway that mediates the nuclear translocation of EGFR. SKHep-1 cells, a liver cell line, was used. To determine differences in the subcellular distribution of EGFR after EGF stimulation, nuclear and non-nuclear cell fractions were analyzed by immunoblot and by real time imaging and confocal immunofluorescence. Small interference RNA was used to knockdown clathrin and caveolin. Intracellular trafficking of EGF was examined by time lapse confocal imaging of EGF labeled with Alexa 488 or 555. Cell fractionation studies showed that EGFR was detectable in the nucleus after EGF stimulation, with a peak in nuclear receptor after 10 min. Movement of EGFR to the nucleus was confirmed by confocal immunofluorescence. Alexa-labeled EGF co-localized with EGFR, and internalization of labeled EGF was blocked by treatment with caveolin siRNA. EGF internalization also was impaired by the dynamin dominant negative mutant K44A. Cell fractionations furthermore showed that appearance of EGFR in the nucleus could be blocked by either Methyl-beta-Cyclodextrin (M β CD) to disrupt lipid rafts or treatment with caveolin siRNA. However, knockdown of clathrin with siRNA did not block nuclear accumulation of EGFR.

1. Introdução

1.1. O receptor do fator de crescimento epidermal

Receptores de superfície celular medeiam a comunicação entre o meio externo e o interior da célula. Eles integram sinais extracelulares como fatores de crescimento ou hormônios e regulam uma grande diversidade de vias de sinalização e respostas celulares. Uma classe de receptores de membrana, os receptores do tipo tirosina cinase (RTKs), desempenham um papel essencial nesse processo. Trata-se de proteínas transmembrana com habilidade intrínseca de transferir grupos fosfato da adenosina trifosfato (ATP) a resíduos de tirosina contidos em substratos celulares (USHIRO; COHEN, 1980; SCHLESSINGER, 2000). Diferentes tipos de RTKs são ativos durante o desenvolvimento embrionário e na homeostase em adultos, onde eles controlam muitos processos celulares fundamentais como o ciclo celular, metabolismo, diferenciação, migração e proliferação celular (SCHLESSINGER, 2000).

O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) é o membro protótipo da classe dos RTKs. Em mamíferos, ele é expresso em uma variedade de tecidos de origens epitelial, mesenquimal e neuronal, onde determina processos celulares como crescimento, motilidade e sobrevivência (WELLS, 1999). Como regulador de proliferação e diferenciação celular, o EGFR é requerido para o desenvolvimento epitelial e tem uma importante função na formação de diversos órgãos em embriões (GOSPODAROWICZ, 1981). Em adição a essas funções fisiológicas, o EGFR também tem sido implicado em estados patológicos, como a progressão do câncer (MOSCATELLO *et al.*, 1995; SALOMON *et al.*, 1995). Quando foi primeiramente purificado e sequenciado por Julian Downward e colaboradores em 1984, o EGFR apresentou alto nível de similaridade com a sequência do oncogene aviário de leucemia eritroblástica, *v-erbB*. Mais tarde, outras proteínas relacionadas foram identificadas, as quais foram agrupadas e nomeadas ERBB. Assim, o EGFR, também chamado ERBB1, pertence à família ERBB dos RTKs, que compreende outros três receptores: ERBB2 (também conhecido como NEU), ERBB3 e ERBB4 (GSCHWIND *et al.*, 2004).

Onze ligantes são conhecidos por ativar receptores ERBBs e sete deles têm afinidade ao EGFR. Dentre os sete, EGF, fator de crescimento

transformante α (TGF- α), anfiregulina e epigenina ligam-se especificamente ao EGFR. Betacelulina, epiregulina e fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina (HB-EGF) ligam-se a EGFR e ERBB4 (HARRIS *et al.*, 2003). Todos os ligantes são sintetizados como proteínas transmembrana e se inserem na membrana plasmática, sendo clivados por proteases de superfície celular para liberar os fatores de crescimento maduros. A ativação dos receptores pode ser autócrina ou parácrina (HARRIS *et al.*, 2003).

O EGFR é sintetizado a partir de um polipeptídeo precursor de 1210 resíduos de aminoácidos e, após a clivagem da sequência amino-terminal, a proteína de 1186 resíduos é N-glicosilada e direcionada à membrana plasmática. O receptor maduro é uma glicoproteína de 170 kDa (ULLRICH *et al.*, 1984) e consiste em uma cadeia modular, com uma região extracelular para interação com o ligante (ou ectodomínio), um domínio transmembrana e um domínio de tirosina cinase que é flanqueado às regiões justamembrana e carboxi-terminal regulatória (BURGESS *et al.*, 2003) (Figura 1).

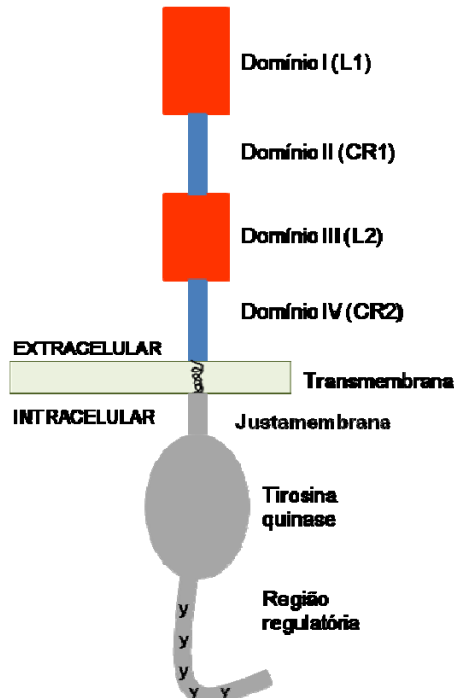


Figura 1: Estrutura do EGFR. Representação esquemática da organização em domínios do EGFR. Esse RTK apresenta uma região transmembrana com quatro domínios (domínios I, II, III e IV ou L1, CR1, L2 e CR2), um domínio transmembrana, uma região justamembrana, um domínio tirosina cinase e uma região carboxi-terminal regulatória. Y = Tirosina.

A região extracelular é constituída por quatro domínios distintos, de dois tipos diferentes, sendo os domínios I e III repetições ricas em leucina (também chamados L1 e L2) e os domínios II e IV ricos em cisteína (também chamados CR1 e CR2), que ocorrem na ordem I-II-III-IV ou L1-CR1-L2-CR2 (LAX *et al.*, 1988; WARD *et al.*, 1995) (Figura 1). Os domínios I e III contêm os sítios onde os ligantes são acoplados e o domínio II apresenta uma alça importante para a formação de dímeros do receptor (OGISO *et al.*, 2002). Evidências indicam que a região justamembrana tem funções regulatórias na associação com proteínas como a calmodulina (MARTÍN-NIETO; VILLALOBO, 1998) e na internalização do receptor após ativação com o ligante (KIL; CARLIN, 2000). O domínio tirosina cinase, como em outras proteínas da classe, apresenta um sítio de ligação ao ATP entre os lobos amino- e carboxi-terminal, onde o grupo γ -fosfato fica posicionado para ser transferido a tirosinas aceptoras no substrato, que pode ser a cauda carboxi-terminal do EGFR (STAMOS *et al.*, 2002). Os resíduos de tirosina fosforilados na região carboxi-terminal modulam vias de sinalização. Nessa região há também resíduos de serina/treonina cuja fosforilação tem sido relacionada a processos de regulação negativa da sinalização e sequências que parecem ser importantes para a endocitose do receptor (TONG *et al.*, 2009).

A unidade funcional na sinalização via RTK são dímeros. O EGFR forma homodímeros, assim como três heterodímeros funcionais com os outros receptores ERBB (CITRI; YARDEN, 2006). A dimerização é estabelecida quando a alça no domínio II extracelular é atrelada a um “bolso” na base do mesmo domínio no receptor parceiro (OGISO *et al.*, 2002). Inicialmente foi sugerido que o EGF liga-se simultaneamente a duas moléculas de EGFR induzindo assim a dimerização (GULLICK, 1994). Entretanto, evidências indicam que na membrana há pré-dímeros desses receptores (GADELLA; JOVIN, 1995; SAKO *et al.*, 2000) e a interação com seus ligantes na proporção de 2:2 causa um rearranjo em cada subunidade devido a rotação do domínio transmembrana (MORIKI *et al.*, 2001). A transição para a forma dimérica libera as interações inibitórias que mantêm o receptor inativo e permite a interação com o ligante, o que estabiliza o dímero (MORIKI *et al.*, 2001).

A dimerização do EGFR é necessária, mas não suficiente, para sua ativação; a interação com o ligante é requerida. Nesse processo, a atividade

tirosina cinase do receptor aumenta e são fosforilados resíduos de tirosinas na cauda carboxi-terminal do parceiro, caracterizando uma ativação *trans* (JORISSEN *et al.*, 2003). As resultantes fosfotirosinas servem como sítio de ancoragem para proteínas com domínio de ligação a fosfotirosinas (PTB) e domínio de homologia a proteína Src 2 (SH2) em proteínas sinalizadoras ou adaptadoras, formando complexos de sinalização (PRENZEL *et al.*, 2001). Algumas proteínas ancoradas ao EGFR dessa maneira e os resíduos de tirosina que medeiam essa associação estão listados na tabela 1.

Tabela 1: Proteínas sinalizadoras que são diretamente associadas ao EGFR, suas funções e sítios de ligação preferidos no EGFR.

Proteína	Função	Sítio de ligação no EGFR
Grb2	Adaptadora	pY 1068, pY 1086
Shc	Adaptadora	pY 1148, pY 1173
Src	Tirosina cinase	pY 891, pY 920
Abl	Tirosina cinase	pY 1086
SHP-1	Fosfatase	pY 1173
PLC γ	Fosfolipase	pY 1173 (N-SH2), pY 992 (C-SH2)

(Adaptado de JORISSEN *et al.*, 2003)

Dada a diversidade funcional das proteínas que são complexadas ao EGFR após a autofosforilação, o estímulo com EGF resulta na ativação simultânea de diversas vias de transdução de sinal funcionalmente interligadas (JORISSEN *et al.*, 2003). As principais vias de sinalização clássicas iniciadas pelo EGFR estão sumarizadas e esquematizadas na Figura 2.

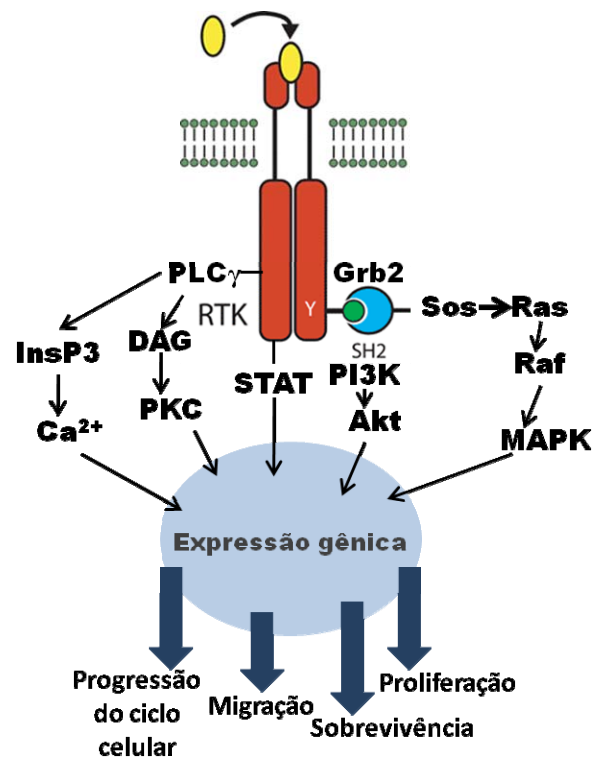


Figura 2: Sinalização clássica via EGFR. O EGFR induz respostas de progressão do ciclo celular, migração, sobrevivência e proliferação através de cascatas de transdução de sinais iniciadas por Ras, PI3K e PLC γ e pela ativação direta do fator de transcrição STAT.

A proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento (Grb2) é chave para indução da via da Ras/proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (LOWENSTEIN *et al.*, 1992). Ela é normalmente localizada no citosol e constitutivamente ligada ao homólogo de *son of sevenless* (Sos), um fator de troca de nucleotídeos de guanina para a pequena proteína G Ras. Com a ativação do EGFR, o domínio SH2 da Grb2 liga-se diretamente às fosfotirosinas na cauda carboxi-terminal ou indiretamente, por se unir à Shc (proteína contendo domínio homólogo a Src) associada ao receptor e fosforilada em tirosinas (SASAOKA *et al.*, 1994; HASHIMOTO *et al.*, 1999). A Shc, através do seu domínio PTB, liga-se ao EGFR ativado (HASHIMOTO *et al.*, 1999). A ancoragem com o EGFR ou com a Shc ligada facilita a interação da Grb2/Sos com Ras, resultando na troca de guanosina difosfato (GDP) ligado por guanosina trifosfato (GTP) e, portanto, na ativação da Ras. Por conseguinte, a Ras ativa o homólogo 1 ao oncogene viral de leucemia murina (Raf-1) que, por sua vez, leva à fosforilação e ativação das cinases reguladas por sinais extracelular 1 e 2 (Erk 1/2), através de uma série de cinases

intermediárias. Erk 1/2 ativadas translocam para o núcleo e ativam fatores de transcrição, como Elk-1 e c-fos, resultando por fim em proliferação celular (JOHNSON; VAILLANCOURT, 1994). Além das Erks outras MAPKs são alvos do EGFR, entre elas as cinases de amino-terminal c-Jun (Jnks), a proteína cinase ativada por mitógeno 14 (p38) e a Erk-5, que apesar de serem ativadas por vias diferentes, geram respostas de progressão do ciclo celular e proliferação (KATO *et al.*, 1998; JOHNSON; LAPADAT, 2002).

Src, uma proteína tirosina cinase não-receptor associada a membrana, coopera na sinalização via EGFR. Seu domínio SH2 é ancorado a tirosinas específicas no EGFR (Tabela 1) e essa interação é bidirecional: o Src pode se ligar, fosforilar e ativar o receptor, e vice-versa (BELSCHES *et al.*, 1997). A ligação do Src com o EGFR cria sítios de ligação para a p85, aumentando sua fosforilação e, conseqüentemente, ativa a via das fosfatidilinositol-3-cinases (PI3K) (STOVER *et al.*, 1995).

A classe Ia de PI3K é fortemente ativada por RTKs (SCHLESSINGER, 2000). Sua forma ativa converte o lipídeo de membrana plasmática fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃). Um dos alvos mais estudados desse segundo mensageiro é a serina/treonina cinase Akt, também chamada proteína cinase B (PKB), e a cinase dependente de fosfoinosítido 1 (PDK1). A associação do PIP₃ na membrana plasmática recruta e aproxima essas duas proteínas e facilita a fosforilação da Akt pela PDK1 (CANTLEY, 2002). PKB/Akt fosforila e regula a função de muitas proteínas envolvidas em processos de sobrevivência, proliferação e migração celular. Essa via é a principal mediadora do efeito antiapoptótico resultante da ativação do EGFR (CANTLEY, 2002).

A fosfolipase C- γ (PLC γ) liga-se diretamente às fosfotirosinas no EGFR (Tabela 1), sendo assim fosforilada e ativada. Dessa forma, ela catalisa a hidrólise do PIP₂ produzindo dois importantes segundo mensageiros: o diacilglicerol (DAG) e o inositol 1,4,5-trifosfato (InsP₃) (KAMAT; CARPENTER, 1997). O DAG é cofator para ativação da serina/treonina cinase PKC, enquanto o InsP₃ medeia a liberação de cálcio de estoques intracelulares. A PKC ativa muitos componentes de sinalização, incluindo enzimas MAPKs (MCCLELLAN *et al.*, 1999). Através do InsP₃, o EGFR pode ativar enzimas dependentes de

cálcio como o fator nuclear kappa B (NF κ B), que induz a expressão de genes envolvidos no crescimento celular (SUN; CARPENTER, 1998).

A fosfolipase D (PLD) é outro mediador-chave na sinalização via EGFR. Em resposta ao estímulo com EGF, ela hidrolisa fosfatidilcolina para gerar colina e o segundo mensageiro ácido fosfatídico (PA), que ativa a via Ras/MAPK através da interação com a proteína Sos (LEE *et al.*, 2009). PA também ativa mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), que regula a tradução de RNA mensageiros e, por conseguinte, o crescimento e proliferação celular (FANG *et al.*, 2001).

Proteínas de transdução de sinal e ativadoras de transcrição (STAT) também estão implicadas na função do EGFR. Em particular, STAT-1, 3 e 5 são ativadas por esse receptor (QUESNELLE *et al.*, 2007). Evidências indicam que esses fatores de transcrição são constitutivamente associados ao EGFR em uma forma inativa, e sua atividade transcricional é dependente da atividade tirosina cinase do receptor diretamente (XIA *et al.*, 2002) ou mediada por Src (OLAYIOYE *et al.*, 1999). Uma vez estimuladas, as STATs translocam para o núcleo e ativam a transcrição de proteínas que induzem progressão do ciclo celular, proliferação e inibição de apoptose (QUESNELLE *et al.*, 2007).

A sinalização via EGFR pode ainda ser regulada negativamente. As cascatas iniciadas em resposta a sua ativação podem ser atenuadas por proteínas fosfatases como a SHP-1 (ÖSTMAN; BÖHMER, 2001). Do mesmo modo, a endocitose induzida por ligante é geralmente considerada um mecanismo de regulação negativa (BEGUINOT *et al.*, 1984; SORKIN *et al.*, 2008).

A sinalização via fatores de crescimento está relacionada à patogênese do câncer humano (NORMANNO *et al.*, 2006). Células tumorais geralmente apresentam menor requerimento de fatores de crescimento exógenos para manter as altas taxas de proliferação, devido a sua habilidade de produzir grande quantidade desses peptídeos, que as ativam de modo autócrino (DE LARCO; TODARO, 1978). Além disso, diferentes mecanismos contribuem para a amplificação do sinal gerado por fatores de crescimento, como por exemplo, a maior expressão de receptores, aumentando assim a sensibilidade aos ligantes (SALOMON *et al.*, 1995). Há muitos proto-oncogenes que codificam

fatores de crescimento ou seus receptores ou ainda proteínas envolvidas nas cascatas de transdução de sinal induzidas por eles (STORMS; BOSE, 1989).

O EGFR e seus ligantes contribuem com processos relevantes para o desenvolvimento e progressão tumoral (regulam sobrevivência, proliferação celular e angiogênese, por exemplo), sendo bem documentado seu papel na patogênese do câncer (SALOMON *et al.*, 1995; NORMANNO *et al.*, 2001). A amplificação do gene do EGFR ocorre em tumores humanos como os de cabeça e pescoço (DASSONVILLE *et al.*, 1993), pâncreas (TOBITA *et al.*, 2003), mama (XUE *et al.*, 2006), estômago (YOSHIDA *et al.*, 1989), bexiga (NEAL *et al.*, 1990), entre outros (NORMANNO *et al.*, 2006). Contudo, em grande parte dos tumores em que esse gene é amplificado há mutações na sua sequência (FREDERICK *et al.*, 2000). As alterações genéticas no EGFR criam formas aberrantes do receptor, que são capazes de gerar sinais mais fortes e, muitas vezes, independentes de ligantes, o que contribui para a malignidade das células tumorais (YAMAMOTO *et al.*, 2009). Não obstante, pacientes com tumores que apresentam alta expressão de EGFR tendem a ter um pior prognóstico (GRIMAUX *et al.*, 1989; KOENDERS *et al.*, 1993; CUNNINGHAM *et al.*, 2005; HIRSCH *et al.*, 2009).

Tendo em vista que o EGFR é superativado em uma variedade de tumores humanos, ele é um importante alvo para o tratamento de câncer. Com a finalidade de inibir a ação desse receptor em células tumorais, diferentes estratégias terapêuticas foram desenvolvidas, incluindo: anticorpos monoclonais (mAbs), inibidores sintéticos de tirosina cinase, toxinas conjugadas a ligantes do EGFR e terapia antisense para receptores ERBB (BONO; ROWINSKY, 2002; HYNES; LANE, 2005). As abordagens farmacológicas aprovadas e utilizadas na oncologia clínica incluem os mAbs, que agem como antagonistas do receptor por competir com os ligantes e obstruir o sítio de ligação, e os inibidores de tirosina cinase, que competem com o ATP pelo domínio catalítico do receptor (HYNES; LANE, 2005). Atualmente, os mAbs são amplamente utilizados para o tratamento de carcinomas, dentre eles o cetuximab, que liga especificamente ao EGFR com alta afinidade e é um potente inibidor da sinalização (BASELGA, 2001).

O bloqueio do EGFR resulta em inibição significativa do crescimento de células derivadas de vários tipos de carcinoma humano, *in vitro* e *in vivo*

(HYNES; LANE, 2005). No entanto, apenas 10-20% dos pacientes tratados manifestam as respostas clínicas esperadas (ARTEAGA, 2003). A resposta ao tratamento com agentes quimioterápicos anti-EGFR é limitada por resistência intrínseca ou adquirida. Embora as causas não estejam bem esclarecidas, evidências indicam que a resistência adquirida ao tratamento anti-EGFR ocorre devido à perda/inativação de moléculas *downstream* do receptor e alterações na rota de sinalização (BIANCO *et al.*, 2005).

Ao investigar possíveis mecanismos da resistência adquirida, Li e colaboradores (2009) acusaram grande expressão de EGFR no núcleo de células resistentes a cetuximab. Nesse trabalho foi mostrado que essa linhagem celular produz grandes quantidades de EGF, que ativa o receptor e induz sua translocação para o núcleo, esse processo sendo dependente de SFK, uma cinase da família Src. Demonstraram ainda que o bloqueio da SFK, com conseqüente inibição da translocação nuclear do EGFR, aumenta a quantidade desse receptor na membrana plasmática, o que torna as células mais sensíveis ao tratamento. Postulou-se, então, que a localização nuclear do EGFR contribui para a resistência adquirida ao cetuximab *in vitro* e *in vivo*. Paralelamente, outro trabalho demonstrou que mAbs anti-EGFR são capazes de induzir a translocação do EGFR para o núcleo (LIAO; CARPENTER, 2009). De fato, nas últimas décadas emergiram evidências da presença de receptores ERBB no núcleo de células e tecidos em alta atividade proliferativa (XIE; HUNG, 1994; NI *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2001; OFFTERDINGER *et al.*, 2002). Esses achados abriram espectro para um novo modo de sinalização via EGFR, em que esse receptor age diretamente no núcleo regulando funções importantes para a progressão tumoral.

1.2. Internalização e localização nuclear do EGFR

Em 1976, dois anos antes da descoberta do EGFR, Carpenter e Cohen publicaram o primeiro relato sobre a internalização do EGF, no qual foi evidenciado que esse polipeptídeo ligava-se em sítios específicos na superfície das células-alvo e, em seguida, era internalizado e degradado. Instigaram ainda que “os possíveis receptores” para o EGF na membrana plasmática

tornavam-se inacessíveis quando novas moléculas eram adicionadas ao meio. Após a identificação do EGFR, esse fato foi confirmado com a demonstração de que o EGF induz a internalização do seu receptor (HAIGLER; MCKANNA; COHEN, 1979). Estudos subseqüentes estabeleceram o processo linear de ligação-internalização-degradação do EGFR (STOSCHECK; CARPENTER, 1984; BEGUINOT *et al.*, 1984; MILLER *et al.*, 1986). Segundo Herbst *et al.* (1994), consecutivo à internalização, o EGFR é localizado nos endossomos primários e tardios, onde é direcionado a dois destinos: (1) aos lisossomos para degradação proteolítica ou (2) para ser reciclado de volta à membrana plasmática. Essas observações foram extendidas a outros RTKs e receptores acoplados a proteína G, a partir das quais foi inferido que a endocitose de receptores ativados por ligantes poderia atenuar a transdução de sinal (CERESA; SCHMID, 2000).

Contudo, evidências surgiram indicando que o tráfego de RTKs ativados é um processo complexo e altamente regulado, o que seria consistente com mais de uma função, sugerindo que a internalização de receptores não contempla apenas uma diminuição da sinalização do receptor (WILEY; BURKE, 2001). Alguns trabalhos apontaram que alvos *downstream* do EGFR continuam sendo ativados após sua endocitose (MCPHERSON; KAY; HUSSAIN, 2001). Foi demonstrado que as moléculas de EGFR nos endossomos são enzimaticamente ativas, hiperfosforiladas e podem estar associadas a Shc, Grb2 e Sos (DI GUGLIELMO *et al.*, 1994), sendo capaz de ativar as principais vias que levam à sobrevivência e proliferação celular (WANG *et al.*, 2002). Além disso, receptores internalizados podem ativar vias distintas daquelas ativadas na superfície celular (MIACZYNSKA *et al.*, 2004). Bevan *et al.* (1996) já haviam sugerido que um papel-chave da internalização de receptores seria permitir a interação de um receptor ativado com substratos topograficamente distintos, essenciais para a transdução do sinal. Outros estudos deram suporte à idéia de que o tráfego de receptores é um importante mecanismo para regular a especificidade da resposta gerada (CERESA *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2000). Assim, hoje se sabe que o EGFR intracelular é importante para o controle temporal e espacial da sinalização, influenciando diretamente não apenas a duração e a intensidade do sinal, mas também sua correta localização.

Esse modo de regulação é alcançado através da compartimentalização dos elementos sinalizadores em um conjunto dinâmico de múltiplos subdomínios celulares, vesículas e organelas (HOELLER; VOLAREVIC; DIKIC, 2005). O EGFR, embora originalmente conhecido como um receptor de membrana plasmática, já foi descrito no núcleo (MARTI *et al.*, 1990) e, recentemente, em mitocôndria (DEMORY *et al.*, 2009).

A possibilidade de direta translocação nuclear de RTKs tem sido reconhecida (WELLS; MARTI, 2002; CARPENTER, 2003). Foi demonstrado que o ERBB4 após ativação é clivado, liberando um domínio catalítico que vai para o núcleo (NI *et al.*, 2001). Já ERBB2 e ERBB3 foram encontrados intactos nesse compartimento (XIE; HUNG, 1994; OFFTERDINGER *et al.*, 2002). Marti e colaboradores, em 1991, descreveram pela primeira vez a presença do EGFR em núcleos isolados de hepatócitos em regeneração. Além disso, já havia sido demonstrado que durante a regeneração hepática há acúmulo de EGF exógeno no núcleo dessas células (RAPER *et al.*, 1987). A localização nuclear do EGFR foi observada também em outros tecidos em alta atividade proliferativa como placenta humana, mucosa oral humana e útero de ratas grávidas (PLANQUE, 2006).

Tabela 2: Funções biológicas do EGFR nuclear.

Função biológica	Referências
Replicação do DNA	Wang <i>et al.</i> , 2006
Proliferação celular	Lin <i>et al.</i> , 2001; Wang <i>et al.</i> , 2006; Hung <i>et al.</i> , 2008
Transcrição	Lin <i>et al.</i> , 2001; Lo <i>et al.</i> , 2005a; Hanada <i>et al.</i> , 2006; Hung <i>et al.</i> , 2008
Reparo do DNA	Wang <i>et al.</i> , 2006; Wanner <i>et al.</i> , 2008
Progressão tumoral	Lin <i>et al.</i> , 2001; Lo <i>et al.</i> , 2005a; Hanada <i>et al.</i> , 2006; Wang <i>et al.</i> , 2006; Hoshino <i>et al.</i> , 2007; Wanner <i>et al.</i> , 2008

O EGFR nuclear (nEGFR) desempenha funções importantes para o crescimento celular, onde os ligantes são requeridos (MARTI *et al.*, 2001). As especulações acerca das funções moleculares do nEGFR apontaram que ele pode atuar como regulador da transcrição gênica (LIN *et al.*, 2001). Nesse

trabalho foi mostrado que o domínio carboxi-terminal do EGFR conduz a transcrição a partir de sequências ricas em AT, como no promotor da ciclina D1. O estímulo da expressão de ciclina D1 em células tumorais relacionou pela primeira vez a função do nEGFR e proliferação celular (LIN *et al.*, 2001). Outro alvo desse receptor é o promotor da óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Através da interação com STAT3 o nEGFR é recrutado aos motivos ricos em AT no promotor da iNOS, onde ativa sua transcrição e, conseqüentemente, a via do óxido nítrico, que está envolvida na progressão tumoral (LO *et al.*, 2005a). Do mesmo modo, o EGFR associa-se à STAT5 para transativar o promotor da aurora A, resultando em amplificação de centrossomos e desordem de microtúbulos (HUNG *et al.*, 2008). Além de cooperar com as STATs, o nEGFR age com o E2F1 para ativar a expressão do fator de transcrição B-Myb (HANADA *et al.*, 2006). Altos níveis de B-Myb são encontrados em tumores de mama, onde o nEGFR é requerido. Conforme ressaltado por Lo *et al.* (2005a), o EGFR, assim como os outros ERBBs, não apresenta domínio de ligação ao DNA; por isso a associação com outras proteínas que contêm tais domínios é necessária para seu recrutamento à cromatina.

Em adição à função de fator de transcrição, o EGFR pode ativar alvos nucleares assim como faz no citosol. Tal função foi atribuída com a identificação de que o nEGFR fosforila e ativa o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (WANG *et al.*, 2006). A fosforilação da PCNA pelo EGFR estabiliza sua interação com a cromatina e, portanto, suas funções associadas. O aumento dessa ativação coincide com proliferação celular acentuada e está correlacionada à baixa sobrevida de pacientes com câncer (WANG *et al.*, 2006). O EGFR também está implicado na fosforilação da DNA-PK, que é importante para o reparo de DNA dupla fita (WANNER *et al.*, 2008). Possivelmente existem outros alvos nucleares desse receptor que ainda não foram identificados. As funções celulares do nEGFR descritas até o momento estão sumarizadas na Tabela 2.

Um estudo envolvendo pacientes com câncer de mama detectou que a expressão de EGFR no compartimento nuclear tem significância patológica. O EGFR nuclear e não o citosólico está implicado em pior prognóstico para esses pacientes, sendo menor a sobrevivência entre aqueles que apresentaram maior

quantidade de nEGFR (LO *et al.*, 2005b). Similarmente, a expressão desse receptor no núcleo foi correlacionada com a malignidade e capacidade de metastátese de tumores esofágicos (HOSHINO *et al.*, 2007). Foi demonstrado que a concentração de nEGFR fosforilado pode afetar o prognóstico de pacientes com câncer de esôfago. O nEGFR também está envolvido com o desenvolvimento de câncer de ovário (XIA *et al.*, 2009) e carcinoma orofaríngeo, onde é diretamente relacionado com a maior recorrência desses tumores (PSYRRI *et al.*, 2008). Ele também está associado à resistência à terapia do câncer. Conforme apresentado na seção 1.1, a translocação do EGFR para o núcleo é um mecanismo de resistência ao tratamento com cetuximab (LI *et al.*, 2009). A radiação ionizante também induz a translocação (WANNER *et al.*, 2008). Parece que o “seqüestro” nuclear do EGFR é um modo de proteção das células tumorais. Assim, a presença desse RTK no núcleo tem sido cada vez mais reconhecida como uma característica patológica de tumores (LO; HUNG, 2006).

Na perspectiva da biologia do câncer, é plausível que a localização nuclear do EGFR serve como um mecanismo de sustentação da sinalização e suprimento de vias de ativação da progressão tumoral. Logo, o nEGFR torna-se um alvo mais específico e atrativo para o tratamento de diversos tipos de câncer. Acredita-se que o bloqueio da translocação nuclear do EGFR seria uma estratégia eficaz na intervenção do câncer (DITTMANN; MAYER; RODEMANN, 2010), entretanto, a questão sobre como o EGFR é transportado ao núcleo não está bem esclarecida.

Foi demonstrado que em células MDA-MB 468 o tráfego do EGFR entre o núcleo e o citosol depende da interação direta deste com proteínas carreadoras como as importinas $\alpha 1/\beta 1$, para conduzi-lo ao interior do núcleo, e a exportina CRM1, para exclusão nuclear (LO *et al.*, 2006). Porém, os detalhes moleculares acerca da internalização desse receptor não são conhecidos. Sabe-se que a região justamembrana dos ERBBs contém um sinal de localização nuclear (NLS), que é distinto daqueles tradicionalmente encontrados em proteínas que são endereçadas ao núcleo (HSU; HUNG, 2007). No entanto, não se sabe quais moléculas interagem como EGFR para conduzi-lo ao núcleo e nenhum trabalho apresentou evidências diretas sobre qual via endocítica está envolvida nesse processo.

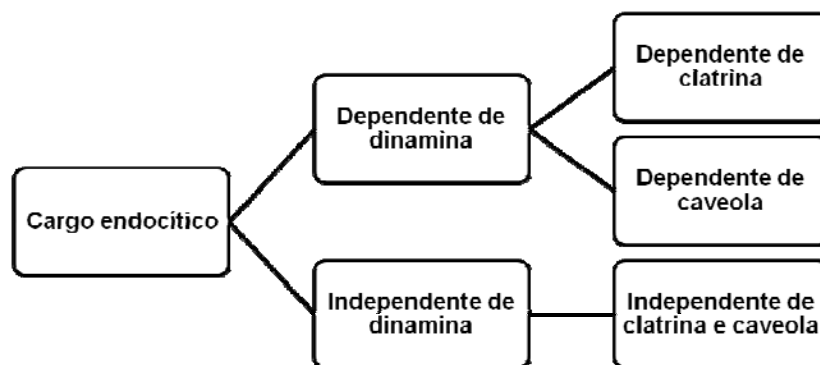
1.3. Endocitose: porta de entrada nas células

Endocitose é o processo pelo qual macromoléculas são carregadas ao interior da célula através de vesículas derivadas da membrana plasmática (CONNER; SCHMID, 2003). Podendo ocorrer por diversos mecanismos, a endocitose é classificada em dois grandes grupos, a fagocitose e a pinocitose. A fagocitose está implicada na captação de grandes partículas e é, em geral, restrita a células especializadas de mamíferos, especialmente células do sistema imune, incluindo macrófagos, monócitos e neutrófilos (CONNER; SCHMID, 2003). Já a pinocitose envolve a captação de fluidos e solutos e ocorre em todos os tipos celulares por pelo menos quatro mecanismos básicos: macropinocitose, endocitose dependente de clatrina, endocitose dependente de caveolas e endocitose independente de clatrina e caveolas (DOHERTY; MCMAHON, 2009). As vias endocíticas diferem em relação ao tamanho das vesículas, a natureza do cargo (pode ser polipeptídeos, receptores transmembrana ou lipídeos) ou o mecanismo de formação das vesículas e a maquinaria protéica que as promove (DOHERTY; MCMAHON, 2009).

A macropinocitose captura grande volume do meio extracelular. Assim como a fagocitose, é caracterizada por formar vesículas maiores que $1\mu\text{m}$, ao passo que as vias clatrina-dependente, caveola-dependente e clatrina- e caveola-independente formam vesículas menores (CONNER; SCHMID, 2003). Pregueamentos na membrana são induzidos por fatores de crescimento ou agentes mitogênicos e, frequentemente, levam à formação de estruturas vesiculares dinâmicas, grandes e heterogêneas, chamadas macropinosomos. A macropinocitose, dessa forma, contribui para a internalização de grande volume de solutos, sendo relevante na captação de antígenos, principalmente nas células dendríticas (MAYOR; PAGANO, 2007).

As vesículas pinocíticas são formadas a partir de invaginações e destacamento desses pedaços da membrana plasmática (DOHERTY; MCMAHON, 2009). A grande GTPase dinamina tem um importante papel nesse processo e está envolvida na endocitose mediada por clatrina (DAMKE *et al.*, 1994) e por caveolas (HENLEY *et al.*, 1998). Diferentes vias independentes de clatrina e caveolas utilizam outras proteínas que

desempenham função na cisão de vesículas, como alguns fatores de ribosilação do ADP (Arf) e pequenas GTPases da subfamília Rho (DONALDSON; KLAUSNER, 1994; QUALMANN; MELLOR, 2003). Assim, as vias endocíticas podem ser classificadas de acordo com os passos essenciais que são requeridos na formação da vesícula, onde um determinado cargo pode ser internalizado por vias que requerem ou não a dinamina, como esquematizado abaixo.



A dinamina é uma GTPase de alto peso molecular (massa de 100 kDa) com cinco domínios funcionais: um amino-terminal de hidrólise do GTP, um domínio central, um domínio de homologia a pleckstrina (domínio PH), um efetor GTPase (GED) e um domínio carboxi-terminal rico em prolina (HINSHAW, 2000). Este último contém sítios de ligação a domínios SH3, essencial para interações proteína-proteína, o que é importante na regulação da endocitose, principalmente por proteínas sinalizadoras (MCPHERSON, 1999). Fosfolípidos aniônicos (ou lipossomos) ligam-se ao domínio PH e estimulam a atividade GTPase, promovendo a união das moléculas de dinamina e sua ativação (TUMA *et al.*, 1993). O domínio PH da dinamina liga preferencialmente ao PIP₂ na membrana plasmática, o que foi demonstrado ser essencial para a localização da dinamina e para a endocitose (SALIM *et al.*, 1996). Estudos estruturais mostraram que a dinamina existe como tetrâmeros que podem ser unidos em forma de anéis ou espirais, formando uma estrutura semelhante a um colar em torno do “pescoço” da invaginação da membrana (CARR; HINSHAW, 1997) (Figura 3). A dinamina é capaz de gerar força, de modo que uma vez enrolada no seu substrato, ela torce o “pescoço” da

invaginação e promove a cisão desse pedaço de membrana, liberando a vesícula no interior da célula (HINSHAW, 2000).

A dinamina K44A – a lisina na posição 44 é substituída por uma alanina – é uma ferramenta útil para o estudo da dependência dessa proteína na endocitose. A lisina 44 está localizada no domínio amino-terminal, num sítio ativo conservado nas GTPases (DAMKE *et al.*, 1994). A mutação lisina→alanina reduz a ligação dos nucleotídeos, gerando um dominante negativo (DAMKE *et al.*, 1994). Essa forma mutante da dinamina bloqueia os eventos iniciais da endocitose dependente de dinamina (BLIEK *et al.*, 1993).

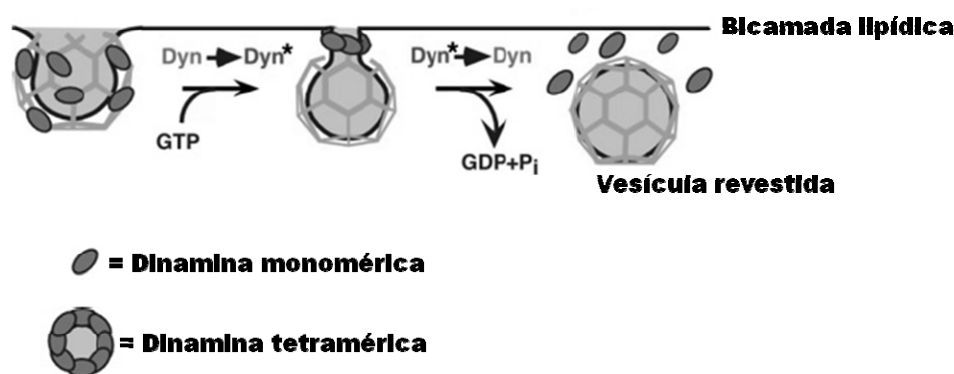


Figura 3: Função da dinamina. A dinamina utiliza a força gerada da hidrólise do GTP para destacar invaginações revestidas da membrana e formar vesículas endocíticas. Dyn = dinamina. Dyn* = dinamina ativa.

Adaptado de Mettlen *et al.*, *Biochemical Society Transactions*, 2009.

Os cargos endocíticos são recrutados por mecanismos específicos e se concentram nas invaginações revestidas na membrana para subsequente internalização (SORKIN, 2004). O revestimento mais bem estudado é aquele em que a principal unidade é a clatrina, uma proteína com estrutura de “três pés”, formada por três cadeias pesadas (CHC), cada uma com uma cadeia leve (CLC) fortemente associada (BRODSKY *et al.*, 2001). As moléculas de clatrina, junto com as proteínas de montagem AP2 e AP180, se associam para formar estruturas como caixas poligonais que coordenam as funções relacionadas à seleção do cargo e a formação das vesículas (BRODSKY *et al.*, 2001). A endocitose mediada por clatrina realiza a contínua captura de nutrientes

essenciais, como por exemplo, partículas de colesterol de baixa densidade (LDL) ligadas ao seu receptor e transferrinas carregadas com ferro ligadas ao receptor (SORKIN, 2004). Essa via foi inicialmente referida como “endocitose mediada por receptor”, porém hoje está claro que esse termo é impróprio pois a maioria das vias pinocíticas envolvem interações específicas entre ligantes e receptores (SORKIN, 2004).

Ao contrário das invaginações revestidas de clatrina, as caveolas são abundantes em células endoteliais, musculares e adipócitos, mas não detectadas em linfócitos e neurônios (PARTON; RICHARDS, 2003). Caveolas são invaginações da membrana em forma de balão de 50-80 nm (YAMADA, 1955), presentes na superfície de muitas células de mamíferos (PARTON, 2003). O maior constituinte protéico e marcador molecular das caveolas é a proteína caveolina (CAV). Existem três isoformas de caveolina, nomeadas CAV- 1-3. A CAV-1 é necessária para a formação de caveolas em qualquer tipo celular que apresente essas estruturas, enquanto as CAV-2 e 3 são co-expressas com a primeira em tecidos específicos; a CAV-3 é predominantemente encontrada em células musculares esqueléticas e cardíacas (PARTON, 2003). As caveolinas são proteínas integrais de membrana que se ligam diretamente a colesterol e ácidos graxos. A CAV-1 é palmitoilada em sua cauda carboxi-terminal e forma oligômeros de alto peso molecular (PARTON, 2003). Caveolas também são ricas em esfingolipídeos e colesterol (SIMONS; IKONEN, 1997). Nessas estruturas ainda são comumente concentradas proteínas sinalizadoras e proteínas ancoradas a glicosil fosfatidilinositol (SPRENGER *et al.*, 2004). Os cargos caveolares são diversos, indo de lipídeos e proteínas a patógenos (PARTON; RICHARDS, 2003).

As vias independentes de dinamina e, portanto, independentes de clatrina e caveolas, utilizam pequenas GTPases como a CDC42 da subfamília Rho e a ARF6 (CHADDA *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2009). Os carreadores primários que brotam da superfície celular pela endocitose dependente de CDC42 apresentam amplas e longas invaginações, em contraste às pequenas e esféricas características das vias reguladas por clatrina e caveolas; portanto, um grande volume de fase líquida é co-internalizado em um único evento de brotamento comparado aos outros mecanismos de internalização (CHADDA *et al.*, 2007). O papel da ARF6 tem sido sugerido na endocitose de muitas

proteínas como moléculas do complexo maior de histocompatibilidade de classe I (MHC I), integrinas $\beta 1$, carboxipeptidase E e e-caderina, sendo importante no tráfego entre membranas e reciclagem (DUNPHY *et al.*, 2006; MAYOR; PAGANO, 2007; WALSENG; BAKKE; ROCHE, 2008). Em comparação às vias dependentes de dinamina, essas rotas foram menos caracterizadas até o momento.

Não apenas antígenos e partículas extracelulares, mas também moléculas de superfície celular podem ser transportadas através da membrana plasmática para o interior das células por vias distintas. O EGFR é internalizado após ativação e translocado ao núcleo, porém não se sabe ao certo quais desses mecanismos estão envolvidos nesse processo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o mecanismo de translocação do EGFR para o núcleo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar se o EGFR é internalizado e translocado para o núcleo via endocitose dependente de dinamina.
- Avaliar se o EGFR é internalizado e translocado para o núcleo via endocitose dependente de clatrina e/ou caveolas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultura celular

3.1.1 SKHep-1

Células SKHep1, células endoteliais humanas de tumor hepático, foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e cultivadas em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) suplementado com 5mM de bicarbonato de sódio, 100 unid/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de streptomicona e 10% de soro fetal bovino (DMEM completo), a 37⁰C, em 5% CO₂.

3.1.2 MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB 231

MACL-1 e MGSO-3 são linhagens de câncer de mama humanas (CORREA *et al.*, 2009) gentilmente cedidas pelo professor Dr. Alfredo Miranda de Goes (UFMG, Belo Horizonte-MG). Células MDA-MB 231 foram obtidas da ATCC. Essas células foram cultivadas em DMEM completo, a 37⁰C, em 5% CO₂.

3.1.3 Hepatócitos primários

Hepatócitos foram isolados de fígado de ratos *Sprague-Dawley* machos através de perfusão com colagenase, como previamente descrito por Boyer e colaboradores (1990). Essas células foram cultivadas em meio L15 (Invitrogen) suplementado com 100 unid/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de streptomicona e 10% de soro fetal bovino, a 37⁰C, em 5% CO₂. Os hepatócitos foram utilizados em até 6 horas após o isolamento.

3.2. Estimulo com fator de crescimento epidermal

Com o objetivo de estimular células com EGF exógeno, estas foram semeadas em placas de 6 poços (35mm) na densidade de 2x10⁵ células/mL, ou em poços de 60mm na densidade de 1x10⁶ células/mL, em DMEM completo. Aguardava-se pelo menos 24 horas para a aderência das células.

As células SKHep-1 eram mantidas em DMEM sem soro por 12-16 horas e os hepatócitos por 4 horas antes de serem estimuladas. Em seguida, eram incubadas com 200ng/mL de EGF (Invitrogen) por 10 minutos a 37°C, em 5% CO₂. A reação era interrompida com a rápida remoção do meio, lavagem com tampão fosfato salino (PBS) e adição de tampão de lise para os experimentos de western blot ou fixação com paraformaldeído 4% para a realização de imunofluorescência.

Nos experimentos de imunofluorescência foram utilizados EGF marcados: EGF conjugado a Alexa-488 (Invitrogen) ou EGF conjugado a Alexa-555 (Invitrogen).

3.3. Transfecção com pequenos RNAs de interferência (siRNA)

Foram utilizados siRNAs para silenciar a cadeia pesada da clatrina 2 (CHC2) e a caveolina 1 (CAV1). A sequência senso (5' → 3') do siRNA para CHC2 era GCAAUGAGCUGUUUGAAGAAG e anti-senso era UCUUCAACAGCUCAUUGCUG (Ambion). A sequência senso (5' → 3') do siRNA para CAV1 era CCUUCACUGUGACGAAUtt e a anti-senso UAUUUCGUCACAGUGAAGGtg (Ambion).

As células SKHep-1, semeadas em placas de 6 poços na densidade de 2x10⁵ células/mL, foram transfectadas usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) como veículo. Inicialmente, para cada poço, 50 nM de siRNA e 10 µl de Lipofectamina 2000 eram adicionados em 250 µl de optimem (Invitrogen) em tubos independentes por 5 minutos e depois os conteúdos dos tubos eram combinados por 25 minutos. Em seguida, essa mistura foi gotejada sobre as células em meio Optimem. As células de grupos controle foram incubadas com 10 µl de Lipofectamina 2000 em Optimem. Após 12 horas o meio de transfecção era trocado por DMEM completo. Uma sequência de siRNA que não possui identidade com nenhum gene foi testado nas mesmas condições descritas acima e nenhum efeito foi observado.

3.4. Transfecção com plasmídeos

Os plasmídeos contendo a sequência da dinamina *wild type* (WT) associada a proteína fluorescente verde (GFP) e a sequência do dominante negativo K44A da dinamina associado a GFP foram gentilmente doados pelo Dr. Pietro De Camilli (Universidade de Yale, New Haven-CT).

Para transfectar células SKHep-1, foi utilizado Lipofectamina 2000 (Invitrogen) como veículo. Resumidamente, para cada poço, os plasmídeos (2µg/poço) e 10 µl de Lipofectamina 2000 foram incubados em 250 µl de DMEM sem soro em dois tubos independentes por 5 minutos que, posteriormente, foram combinados por 25 minutos. Em seguida, essa mistura foi gotejada às células em placas de 6 poços, na densidade de 2×10^5 células/mL. Após 4 horas da transfecção, o meio era trocado para DMEM completo.

3.5. Tratamento com metil-β-ciclodextrina

Células SKHep-1 foram incubadas com 5 mM de MβCD (Sigma) em DMEM sem soro por 30 minutos. Após o tratamento com MβCD as células foram lisadas para realização de western blots ou fixadas com paraformaldeído 4% para a realização de imunofluorescência.

3.6. Extração de proteínas totais e fracionamento celular

A extração de proteínas totais das células foi realizada utilizando o tampão NETN, composto por: 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 20mM de Tris-HCl, pH8,0, 0,5% de Nonidet P-40 e 1% dos coquetéis de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma). O homogenato era sonificado por 1 minuto, incubado no gelo por 10 minutos e depois centrifugado a 16.100g, 20 minutos, a 4°C.

O método de fracionamento celular utilizado nesse trabalho foi descrito por Lin e colaboradores, 2001. Basicamente, depois de lavadas com solução salina tamponada com fosfato (1 M KH_2PO_4 , 1 M K_2HPO_4 e 5 M NaCl, pH7,4 –

PBS), as células eram lisadas em tampão de lise (20 mM HEPES, pH7,0, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,5% Nonidet P-40 e 1% de inibidores de proteases e fosfatases), incubadas no gelo por 10 minutos e, em seguida, homogeneizadas por vórtex. O homogenato era então centrifugado a 1.500g por 5 minutos para sedimentação do núcleo. O sobrenadante era centrifugado a 16.100g por 20 minutos e o sobrenadante resultante formava a fração não-nuclear. O *pellet* nuclear era lavado três vezes com tampão de lise para remover contaminantes da fração não nuclear. O *pellet* era então ressuspenso em tampão NETN e sonificado por 1 minuto. O lisado nuclear era coletado após centrifugação (16.100g, 20 min., 4°C).

Após a extração, as proteínas eram dosadas pelo método de Bradford (Sigma), conforme recomendações do fabricante.

3.7. Western blot

15-40 µg de proteínas eram separadas por eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida), com concentrações de 6% para análise de proteínas de 40-200 kDa ou 10% para proteínas de 20-90 kDa. Em seguida, as proteínas eram transferidas do gel para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (BioRad) pelo sistema de transferência semi-seco (BioRad). A membrana era então bloqueada com 5% de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (1M Tris e 3M NaCl, pH7,4 – TBS) com 0,5% Tween-20 (Sigma) (TBST) por 1 hora e depois incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo primário diluído em TBST com 5% de leite desnatado. Os anticorpos utilizados foram: anti-EGFR policlonal (1:250) (Santa Cruz Biotechnology), anti-EGFR fosforilado em Tyr 1173 monoclonal (1:500) (Millipore), anti-α-tubulina monoclonal (1:10000) (Sigma), anti-lamina B1 policlonal (1:5000) (Abcam), anti-Erk 1/2 fosforilada monoclonal (1:1000) (Cell Signaling), anti-CHC2 monoclonal (1:2000) (BD) e anti-CAV1 policlonal (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). As membranas eram lavadas 3 vezes de 5 minutos em TBST antes de serem incubadas por 1 hora com anticorpo secundário, a temperatura ambiente. Os anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo eram conjugados com peroxidase (1:5000) (Millipore). As bandas foram reveladas por reação de

quimioluminescência com ECL Plus (Amersham). Os filmes foram escaneados e as análises quantitativas realizadas utilizando o software Image J.

3.8. Imunofluorescência

Células SKHep-1 foram plaqueadas em lamínula de 22x22 mm na densidade de 2×10^5 células/mL.

A marcação de lisossomos foi feita através da sonda LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen). As células foram incubadas por 30 minutos com 400nM de LysoTracker e lavadas rapidamente com 2 mL de PBS por 2 vezes.

As células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos, lavadas três vezes com PBS e, em seguida, permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 em PBS. Foram então incubadas em uma solução de bloqueio (PBS contendo 1% de albumina de soro bovina, 0,1% triton, 5% soro de cabra) por 1 hora. Após o bloqueio, as células foram incubadas por 12 horas em PBS 1% albumina de soro bovina (BSA) contendo os anticorpos primários, que eram anti-EGFR (1:200) (Santa Cruz Biotechnology) ou anti-Lamina B1 (1:500) (Abcam). Após 12 horas de incubação, foram lavadas três vezes em PBS, cada lavagem de 5 minutos. Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora em PBS 1% BSA contendo anticorpo secundário: anti-coelho com Alexa 488 (Invitrogen) para o anti-EGFR e anti-camundongo com Alexa-555 (Invitrogen) para anti-Lamina B1, ambos na proporção de 1:500. Nos 20 minutos finais de incubação do anticorpo secundário, era adicionada a sonda de núcleo fluorescente Hoechst (200 ng/mL) (Invitrogen). Após 5 lavagens de 5 minutos com PBS, as lamínulas foram montadas usando a solução de montagem Prolong gold (Invitrogen).

As imagens de imunofluorescência foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 meta com objetiva de imersão em óleo de 63X, abertura numérica de 1,4 e a iris (pinhole) foi mantida abaixo de 2 micrometros. As análises foram realizadas utilizando o software Image J.

4. Resultados

4.1. As células SKHep-1 expressam EGFR e são responsivas ao EGF

A expressão de EGFR foi verificada em quatro linhagens tumorais (SKHep-1, MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB 231) a fim de determinar o(s) modelo(s) celular(es) a ser(em) utilizado(s) nesse trabalho. Lisados dessas células foram submetidos à análise semi-quantitativa pela técnica de western blot, mostrada na figura 4. Foi utilizado um anticorpo da Santa Cruz contra a região carboxi-terminal do EGFR. Nos procedimentos de western blot este anticorpo reconhece uma banda de 150 kDa, que corresponde à subunidade beta do receptor maduro ou, eventualmente, dependendo da resolução do gel pode ser observada uma banda de 170 kDa, que corresponde ao receptor imaturo não processado.

Apenas a SKHep-1 apresenta uma banda fortemente marcada na faixa de massa molecular esperada, aproximadamente 150 kDa. Na MGSO-3 é detectada uma banda mais alta, o que pode ser uma forma mutada do receptor (Figura 4). Portanto, a SKHep-1 é a linhagem que expressa maior quantidade do EGFR com a massa molecular esperada dentre as quatro linhagens celulares disponíveis.

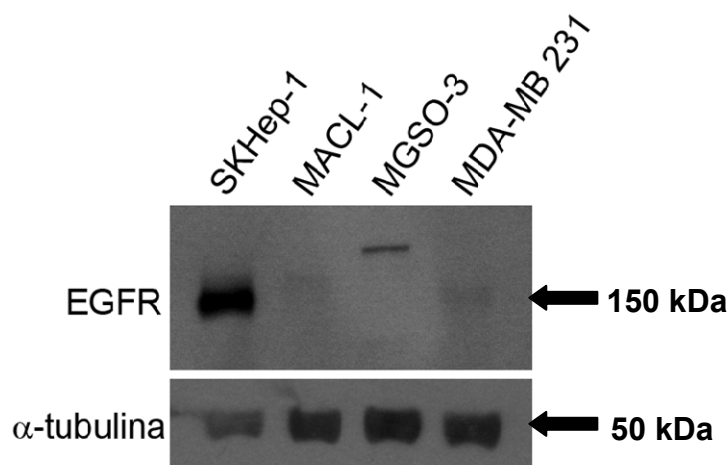


Figura 4: Células SKHep-1 expressam EGFR. Western blot de extrato de proteínas totais das linhagens de tumor de fígado SKHep-1 e de câncer de mama MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB 231. Quantidade de proteínas aplicadas no gel: 40µg/canaleta. A membrana foi incubada com anticorpos anti-EGFR e anti-α-tubulina. A α-tubulina foi utilizada para normalizar a expressão relativa do EGFR. N=3.

Após a verificação de que SKHep-1 expressa grandes quantidades de EGFR, foi avaliado se este era funcional, ou seja, se essas células respondem ao estímulo com EGF. Para isso, foi realizada uma curva de tempo de estímulo e uma de curva dose-resposta de EGF, onde se avaliou a fosforilação de Erk 1/2, um alvo *downstream* do EGFR, através da técnica de western blot (Figuras 5 e 6). Observa-se que as quantidades de pErk 1/2 aumentam com o tempo de estímulo, a partir de 1 minuto, atingindo o pico de resposta em aproximadamente 4 minutos (Figura 5). As quantidades de pErk 1/2 aumentam também com concentrações crescentes de EGF (Figura 6). O pico de fosforilação da Erk acontece com concentrações superiores a 100 ng/mL de EGF.

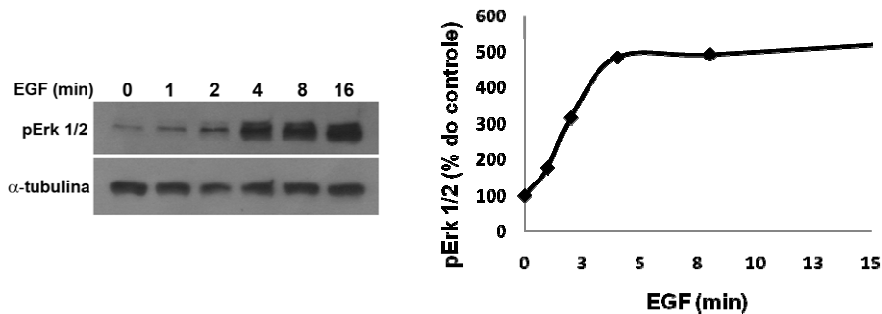


Figura 5: Os níveis de pErk 1/2 aumentam com o tempo de estímulo com EGF em células SKHep-1. Células SKHep-1 foram estimuladas com 200 ng/mL de EGF por 1, 2, 4, 8 e 16 minutos. O tempo 0 indica células não estimuladas. À esquerda: western blot utilizando anticorpos anti-pErk 1/2 e anti- α -tubulina. A α -tubulina foi utilizada como controle para demonstrar que os grupos foram igualmente carregados (20 μ g de cada amostra por canaleta). À direita: os dados de pErk 1/2 foram quantificados e normalizados em relação à α -tubulina. Dados representativos do que foi observado em 3 experimentos independentes.

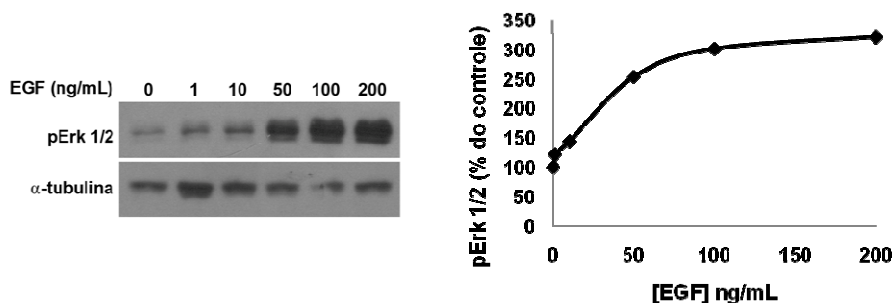


Figura 6: Os níveis de pErk 1/2 aumentam em células SKHep-1 estimuladas com concentrações crescentes de EGF. Células SKHep-1 foram estimuladas com 1, 10, 50, 100 e 200 ng/mL de EGF por 10 minutos. 0 indica células não estimuladas. À esquerda: western blot utilizando anticorpos anti-pErk 1/2 e anti- α -tubulina. A α -tubulina foi utilizada como controle para demonstrar que os grupos foram igualmente carregados (20 μ g de cada amostra). À direita: os dados de pErk 1/2 foram quantificados e normalizados em relação à α -tubulina. Dados representativos do que foi observado em 3 experimentos independentes.

Esses dados sugerem que células SKHep-1 não só expressam EGFR como também são responsivas ao estímulo de EGF. Por conseguinte, elas foram escolhidas como modelo celular para o presente estudo.

Esses testes eram realizados para testar cada lote novo de EGF.

4.2. O EGFR transloca para o núcleo em células SKHep-1

A técnica de imunofluorescência foi utilizada para identificar o complexo EGF/EGFR nuclear em SKHep-1. Células foram estimuladas com EGF-Alexa 488 e marcadas com anti-EGFR e com a sonda de núcleo Hoechst, conforme descrito na seção 3.8. A figura 7 contém as imagens representativas coletadas utilizando os filtros BP 505-550 nm para o EGF-Alexa 488 (verde), LP 560 nm para o EGFR (vermelho) e LP 400 nm para o Hoechst (azul) e a sobreposição dessas três (painel inferior direito). As imagens foram coletadas no módulo multi-track do confocal LSM 510 Meta e a iris (pinhole) foi mandada com 1 unidade de Airy (aproximadamente 1 micrometro) para todos os canais. Nas imagens sobrepostas nota-se a presença de pontos amarelos, cor resultante da sobreposição do verde com o vermelho, o que mostra co-localização do EGF com seu receptor (Figura 7). Importante, esse achado possibilita o uso de EGF marcado como indicador da localização do EGFR. Observa-se ainda na figura 7 que pontos amarelos e vermelhos se sobrepõem com o azul, que indica a região nuclear da célula. A partir desse dado propõe-se que o EGFR é localizado no núcleo após o estímulo com EGF, o qual pode estar sozinho ou em associação com seu ligante.

Com o objetivo de comprovar a localização do EGFR no compartimento nuclear, foi feita uma reconstrução tridimensional (3D) de SKHep-1 estimuladas com EGF-Alexa 488. Essas células tiveram seu núcleo marcado com Hoechst e anticorpo anti-Lamina B1. Hoechst é uma sonda de afinidade a DNA dupla fita, assim indica a parte interna do núcleo enquanto a Lamina B1, por ser uma proteína da face interna do envelope nuclear (fase em contato com a cromatina), indica os limites da organela. Dessa preparação, imagens foram coletadas e a reconstrução 3D realizada utilizando o software Zeiss LSM Image Browser (Figura 8). O painel central da figura 8 mostra o plano medial no

interior do núcleo. Nele se encontram pontos verdes co-localizados com azul e vermelho, o que significa que há EGF no interior do núcleo e no envelope nuclear. O somatório das fatias ópticas nos planos x-z e y-z estão mostrados a cima e à direita, respectivamente, onde observa-se EGF dentro dos limites da Lamina B1(Figura 8). Assim, é possível demonstrar que o EGFR está presente no interior do núcleo de células SKHep-1 estimuladas com EGF.

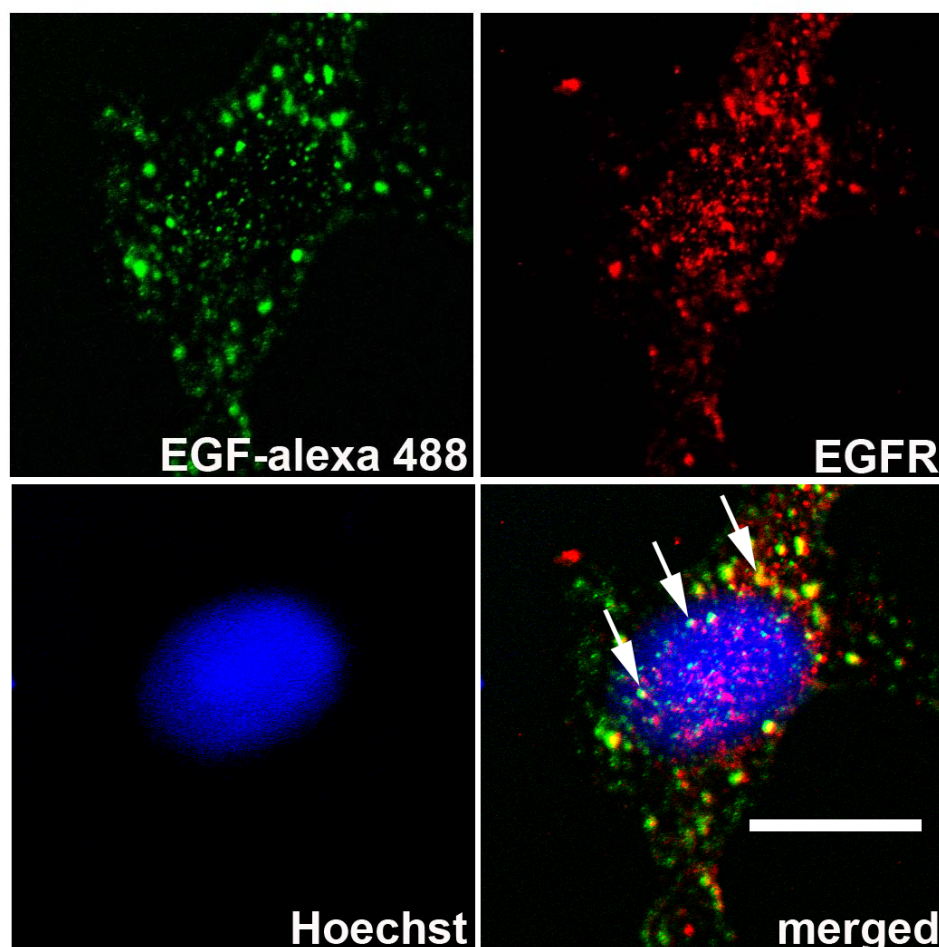


Figura 7: Co-localização de EGF e EGFR no núcleo de células SKHep-1. Imunofluorescência de SKHep-1 estimuladas com 200 ng/mL de EGF-alexa 488 (verde) por 10 minutos, marcadas com anti-EGFR (vermelho) e com a sonda nuclear Hoechst (azul). A imagem é representativa de 40 imagens coletadas. Setas = pontos de co-localização do EGF com EGFR. Barra = 10 μ m.

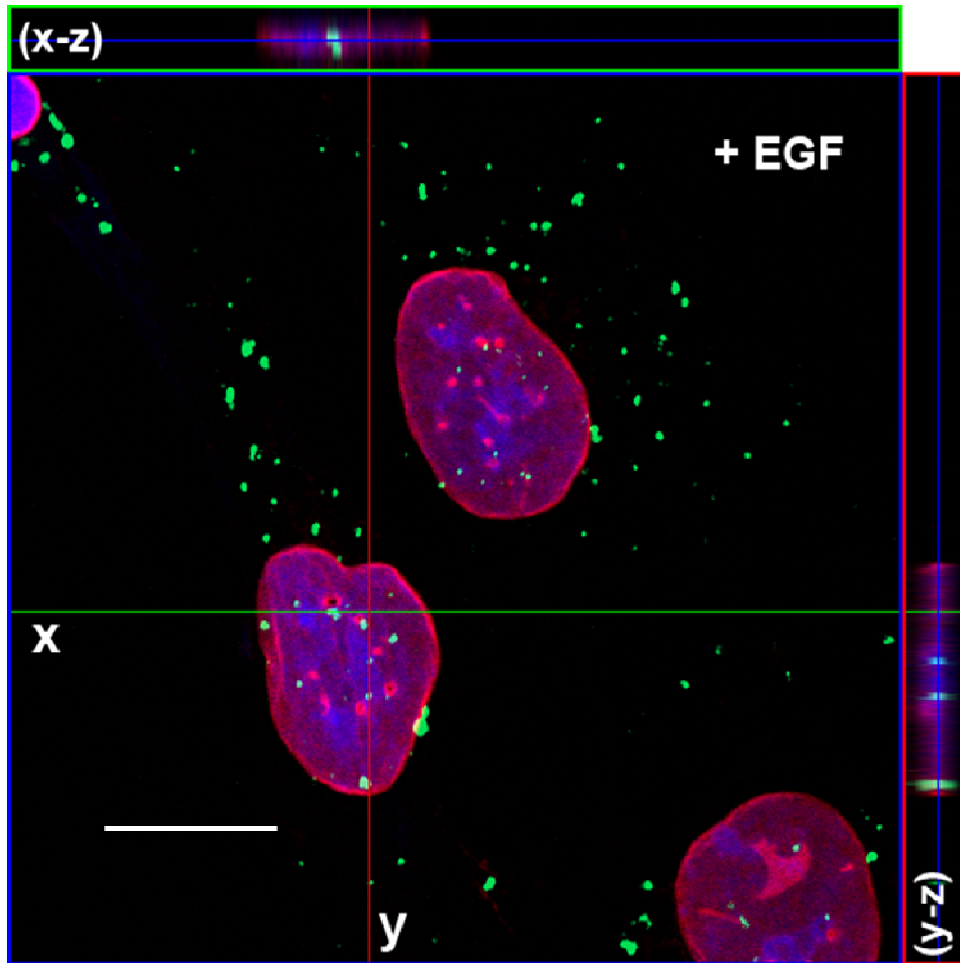


Figura 8: O EGFR é localizado no interior do núcleo de células estimuladas com EGF. Células foram estimuladas com 200 ng/mL de EGF-alexa 488 por 10 minutos e imunomarcadas com anti-Lamina B1 e Hoechst. O EGF está representado em verde, o interior do núcleo (Hoechst) em azul e a face interna do envelope nuclear (Lamina B1) em vermelho. Painel central: plano medial em uma região no interior do núcleo. À cima: reconstrução 3D no plano x-z. À direita: reconstrução 3D no plano y-z. Barra = 10 μ m.

Esses dados mostram que o EGF e possivelmente o complexo ligante-receptor transloca para o núcleo de células SKHep-1. Para confirmar a translocação do EGFR para o núcleo realizamos análises de western blot de frações não nucleares e nucleares de células SKHep-1. Para isso elas foram estimuladas com EGF por 5, 10 e 20 minutos. As resultantes frações não nuclear e nuclear foram analisadas por western blot utilizando anticorpos anti-EGFR e anti-pEGFR, este último reconhecendo o EGFR fosforilado em tirosina 1173 para análise da forma ativa do receptor. α -tubulina e Lamina B1 foram usadas como controle para demonstrar a pureza das frações não nuclear e nuclear, respectivamente (Figura 9). Nesse experimento, nota-se uma redução

gradativa na quantidade de EGFR total na fração não nuclear à medida que aumenta o tempo de estímulo, havendo uma tendência para retorno ao nível basal a partir de 10 minutos (Figura 9a), enquanto na fração nuclear a quantidade de EGFR total aumenta com o tempo, atingindo o pico em aproximadamente 10 minutos (Figura 9b). A redução do EGFR total na fração não nuclear e seu aumento na fração nuclear sugerem que ele transloca para o núcleo após estímulo com EGF. Quanto ao EGFR fosforilado, ocorre aumento da fosforilação nas frações não nuclear e nuclear entre 5 e 10 minutos de estímulo (Figura 9c-d). Estes resultados confirmam que o EGFR transloca para o núcleo de células SKHep-1. Além disso, mostram que o receptor pode ser encontrado ativo no interior do núcleo.

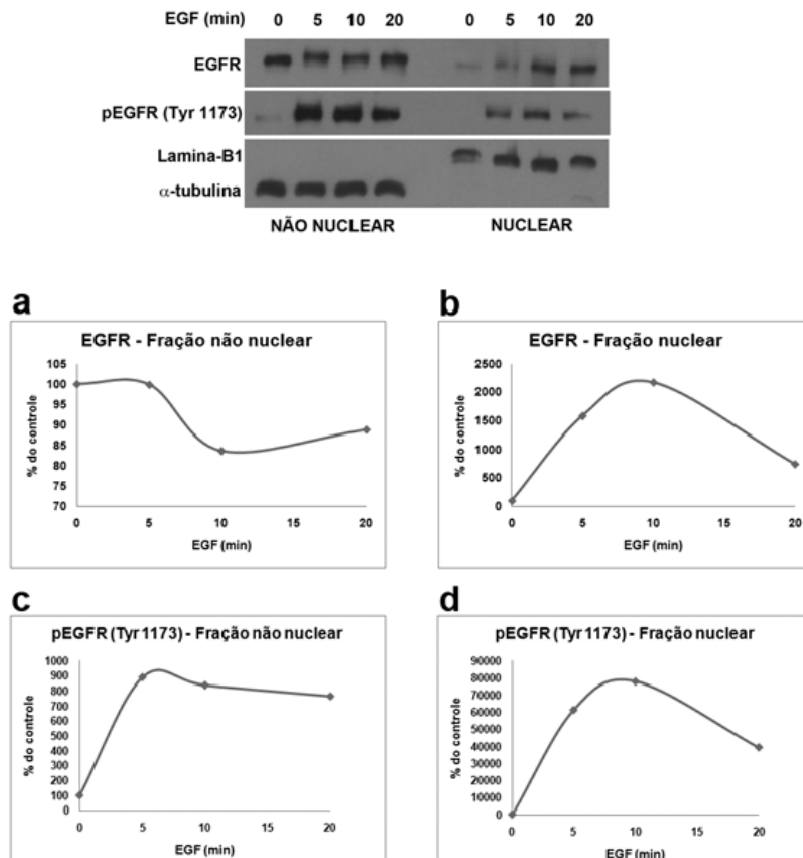


Figura 9: O EGFR é translocado para o núcleo de células SKHep-1. Células foram estimuladas com 200 ng/mL de EGF por 5, 10 e 20 minutos e submetidas a fracionamento celular. Tempo 0 indica células não estimuladas. Painel superior: Western blot das frações não nuclear e nuclear, utilizando anti-EGFR, anti-pEGFR, anti-Lamina B1 e anti- α -tubulina. A Lamina B1 não detectada na fração não nuclear e α -tubulina não detectada na fração nuclear mostram que não houve contaminação entre as duas frações. Essa figura é representativa de três experimentos independentes. Gráficos a-d: Quantificação dos dados de western blot de três experimentos independentes.

4.3. O EGFR transloca para o núcleo em hepatócitos primários

SKHep-1 são culturas imortalizadas derivadas de tumor hepático. Pretendia-se determinar se também ocorre translocação do EGFR para o núcleo em outro tipo celular. Para isso foram utilizados hepatócitos primários, pois já foi demonstrado EGFR nuclear nesse modelo (MARTI *et al.*, 1991). Hepatócitos foram estimulados com 200 ng/mL de EGF por 2,5, 5, 10, 20 e 30 minutos, submetidos a fracionamento celular e as resultantes frações não nuclear e nuclear foram analisadas por western blot. Na Figura 10 estão os resultados desse experimento, que mostram que o estímulo com EGF leva à redução de EGFR em relação ao controle na fração não nuclear e aumento do mesmo na fração nuclear. Embora não haja uma resposta linear da diminuição/aumento de EGFR em função do tempo, sua redução na fração não nuclear se dá ao mesmo tempo em que ocorre aumento na fração nuclear em até 10 minutos de estímulo (Figura 10, gráficos c e d), mostrando a translocação do EGFR também em hepatócitos primários.

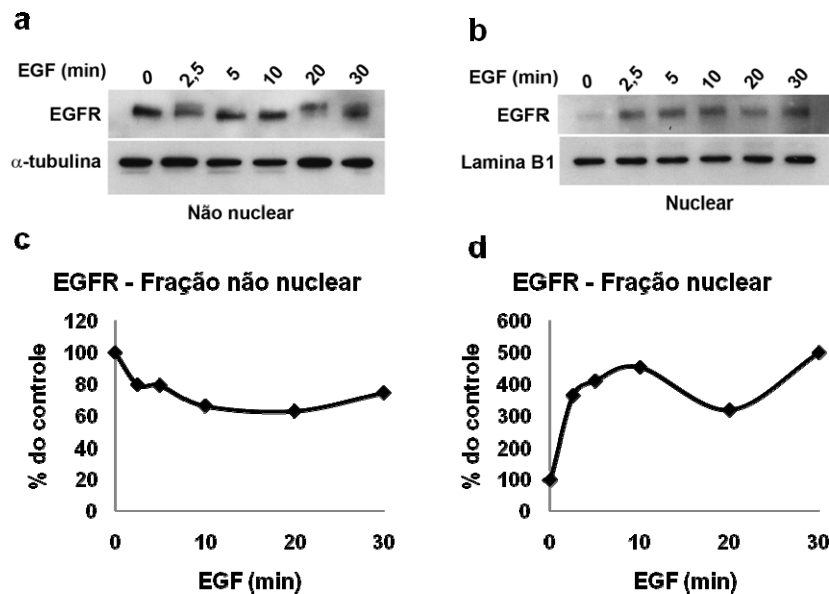


Figura 10: O EGFR transloca para o núcleo em hepatócitos estimulados com EGF. As células foram estimuladas com 200 ng/mL de EGF por 2,5, 5, 10, 20 e 30 minutos e submetidas a fracionamento celular e western blot utilizando anti-EGFR. O controle 0 consiste em células não estimuladas. À cima estão os resultados representativos de três experimentos independentes, (a) western blot da fração não nuclear, onde α -tubulina foi usada como controle, e (b) western blot da fração nuclear, onde Lamina B-1 foi o controle. A membrana da fração não nuclear também foi incubada com anti-Lamina B1 e a membrana da fração nuclear foi incubada com anti- α -tubulina para confirmação de que não houve contaminação entre as suas frações. c e d: Quantificação dos dados de três experimentos independentes das frações não nuclear e nuclear.

4.4. A dinamina K44A bloqueia a translocação do EGFR para o núcleo

Os estudos sobre o mecanismo de translocação do EGFR iniciaram com a avaliação do papel da Dinamina. Foi utilizado plasmídeo contendo a sequência da dinamina dominante negativa K44A, que apresenta falha em sua atividade GTPase, inibindo a formação de vesículas endocíticas dependentes de dinamina (BLIEK *et al.*, 1993). Como controle, foi utilizado plasmídeo com a sequência da dinamina selvagem (*wild type* - WT) humana. Tanto a dinamina K44A quanto a WT eram fusionadas à GFP para observação da sua localização subcelular.

Células SKHep-1 foram transfectadas com esses plasmídeos e, após 48 horas de transfecção, foram estimuladas com EGF-Alexa 555 e marcadas com Hoechst, sendo os resultados representados na Figura 11. Nas células transfectadas com plasmídeos com a sequência da dinamina WT são encontrados pontos vermelhos co-localizados com o azul, o que indica a presença de EGFR no núcleo (Figura 11A, último painel à direita). Em contrapartida, nas células que expressaram a dinamina K44A não foi encontrado EGF no núcleo (Figura 11B). A sobreposição das imagens no painel B mostra que há acúmulo de EGF (vermelho) na periferia da célula. Esse resultado mostra que a dinamina desempenha uma importante função na internalização e conseqüente translocação do EGFR para o núcleo.

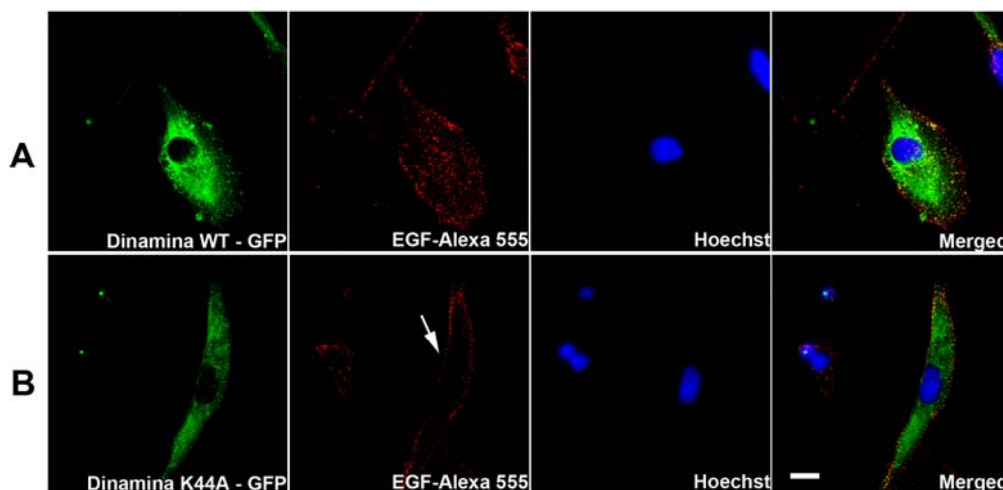


Figura 11: A expressão de dinamina K44A bloqueia a translocação do EGFR para o núcleo. Células SKHep-1 foram transfectadas com plasmídeos para expressar Dinamina WT com GFP (A) e o dominante negativo K44A com GFP (B), representadas em verde. Essas células foram estimuladas com 200 ng/mL de EGF conjugado a Alexa 555 (vermelho) por 10 minutos. O núcleo foi marcado com Hoechst, representado em azul. Os últimos painéis à direita são as sobreposições das imagens coletadas com os três diferentes filtros. Essas imagens são representativas de 40 imagens coletadas. Seta = EGF-Alexa 555. Barra = 10 μ m.

4.5. O *knockdown* de clatrina não bloqueia a translocação do EGFR para o núcleo

Em seguida, foi avaliado se a translocação do EGFR para o núcleo ocorre via endocitose dependente de clatrina. Para isso foi utilizado siRNA para silenciar a cadeia pesada da clatrina 2 (CHC2). O teste desse siRNA está representado na Figura 12, no qual foi demonstrado que 25nM e 50nM são capazes de reduzir a expressão de CHC2 em 52% e 79%, respectivamente.

Células foram transfectadas com siRNA para CHC2, 24 horas depois foram estimuladas com EGF e submetidas a fracionamento celular para análise da expressão de EGFR por western blot. O resultado na Figura 13 mostra que o EGF em células transfectadas, assim como nas não transfectadas, leva a redução na quantidade de EGFR na fração não nuclear, ao mesmo tempo em que ocorre seu aumento na fração nuclear. O aumento de EGFR no núcleo é $26 \pm 10\%$ maior nas células que tiveram *knockdown* de CHC2 em relação a fração não nuclear das células estimuladas e não tratadas (Figura 13b). Nessas amostras a expressão de CHC2 foi verificada para confirmação do *knockdown* (Figura 13, painel superior). Sendo assim, a baixa expressão de CHC2 em SKHep-1 não bloqueou a translocação de EGFR para o núcleo; ao contrário, mais receptores foram translocados.

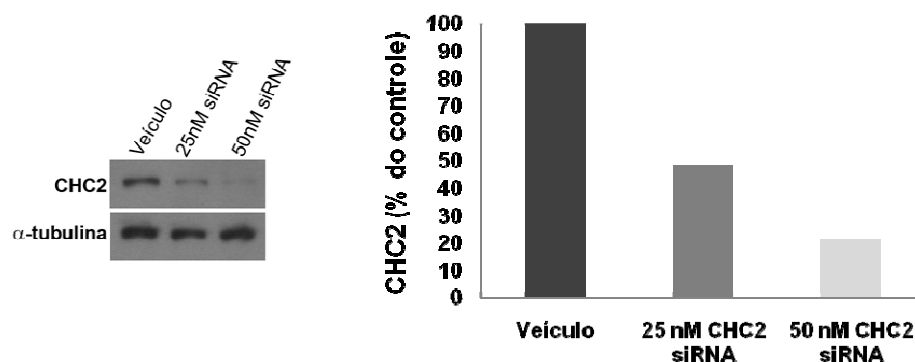


Figura 12: O siRNA para CHC2 reduz a expressão de CHC2. Células SKHep-1 foram transfectadas com 25nM e 50nM de CHC2 siRNA utilizando 10 μ l de Lipofectamina como veículo. Células controle foram incubadas apenas com 10 μ l de Lipofectamina (Veículo). 24 horas após a transfecção foram extraídas proteínas totais dessas células. À esquerda: Western blot utilizando anticorpo anti-CHC2. À direita: Quantificação dos dados de CHC2 normalizados com α -tubulina.

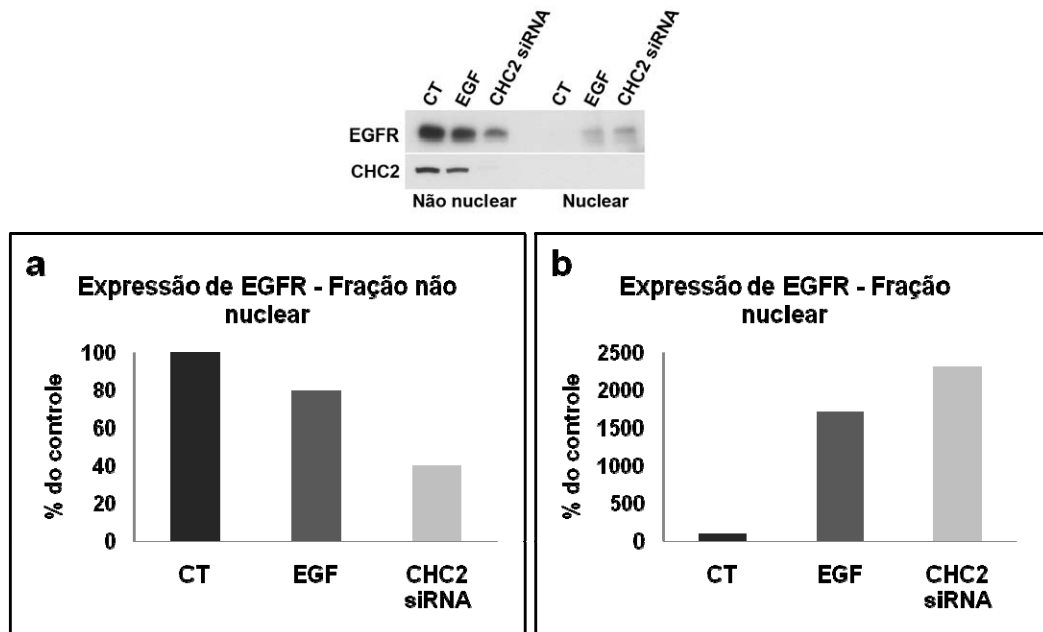


Figura 13: O knockdown de CHC2 não bloqueia a translocação do EGFR para o núcleo. Células SKHep-1 foram transfectadas com 50 nM de CHC2 siRNA, após 24 horas foram estimuladas com 200 ng/mL de EGF por 10 minutos e submetidas a fracionamento celular. CT = controle, células não transfectadas e não estimuladas. EGF = células não transfectadas e estimuladas com EGF. Painel superior: Western blot das frações não nuclear e nuclear utilizando anti-EGFR e anti-CHC2, este último para comprovação do *knockdown*. Essa figura é representativa de dois experimentos independentes. Gráficos: Quantificação dos dados representativos de EGFR da fração não nuclear (a) e nuclear (b).

4.6. O tratamento com metil- β -ciclodextrina diminui a translocação de EGFR para o núcleo

Colesterol e esfingolípídios espontaneamente formam microdomínios na membrana plasmática, denominados balsas lipídica ou *lipid rafts*. Funcionalmente, eles atuam como plataformas para várias classes de proteínas de membrana e estão envolvidos no transporte de proteínas em vias endocíticas (SIMONS; IKONEN, 1997). Caveolas são frequentemente encontradas nestes domínios e agentes sequestradores de colesterol, como a metil- β -ciclodextrina (M β CD), são capazes de romper a estrutura de caveolas e inibir a internalização de vários ligantes (HAILSTONES *et al.*, 1998). Partindo desse princípio, M β CD foi utilizado para avaliar se a translocação do EGFR é dependente de balsas lipídicas.

SKHep-1 tratadas com M β CD foram estimuladas com EGF e submetidas a fracionamentos celular. Análises por western blot (Figura 14) apontam uma

tendência a acúmulo de EGFR na fração não nuclear quando células são tratadas com M β CD (Figura 14a). Na fração nuclear dessas células, não ocorre aumento da quantidade do EGFR em resposta ao EGF (Figura 14b). Por conseguinte, o tratamento com M β CD inibiu a translocação do EGFR para o núcleo.

O efeito do tratamento com M β CD sobre a translocação do EGFR também foi avaliado por imunofluorescência. SKHep-1 foram incubadas com M β CD por 30 minutos, sendo nos 10 minutos finais adicionado EGF-Alexa 488 ao meio. O núcleo dessas células foi marcado com Hoechst. Na Figura 15 está o resultado representativo desse experimento. A sobreposição das imagens no painel B, onde se encontram células tratadas, acusa acúmulo de EGF-Alexa 488 na periferia celular. Não há pontos de co-localização de EGF com o núcleo na maioria das células tratadas com M β CD. No painel A da figura 15 estão representadas as células controle, onde são encontrados EGF no núcleo. Sendo assim, esse experimento confirma a falha na translocação de EGFR para o núcleo quando SKHep-1 são tratadas com M β CD, indicando que as balsas lipídicas podem desempenhar uma função na internalização e translocação do EGFR para o núcleo.

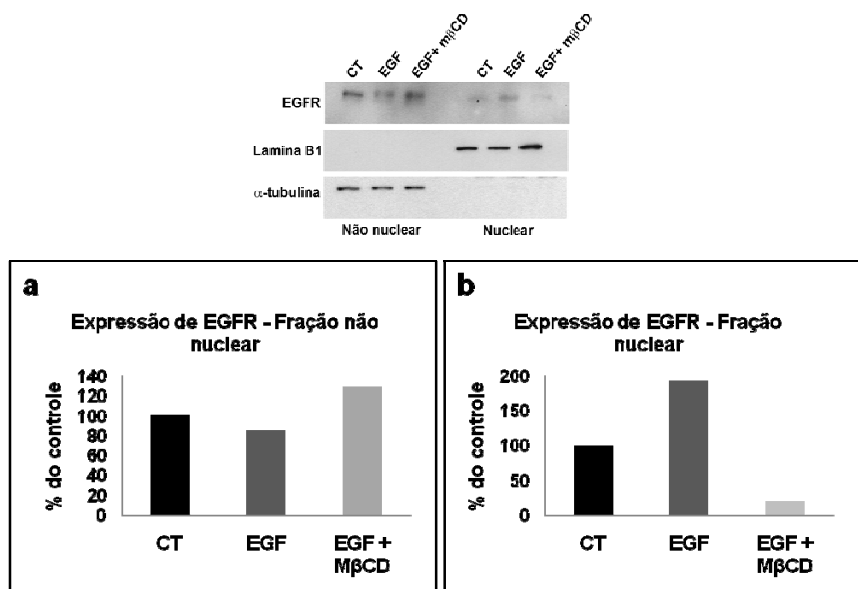


Figura 14: O tratamento com M β CD reduz a translocação do EGFR para o núcleo. Células SKHep-1 foram tratadas com 5 mM de M β CD por 30 minutos, sendo nos 10 minutos finais estimuladas com 200 ng/mL de EGF. CT = controle, células não tratadas e não estimuladas. EGF = células não tratadas e estimuladas com EGF. Essas células foram submetidas a fracionamento celular. Painel superior: Western blot das frações não nuclear e nuclear utilizando anti-EGFR, anti-Lamina B1 e anti- α -tubulina. Essa figura é representativa de três experimentos independentes. Gráficos: Quantificação dos dados representativos de EGFR da fração não nuclear (a) e nuclear (b).

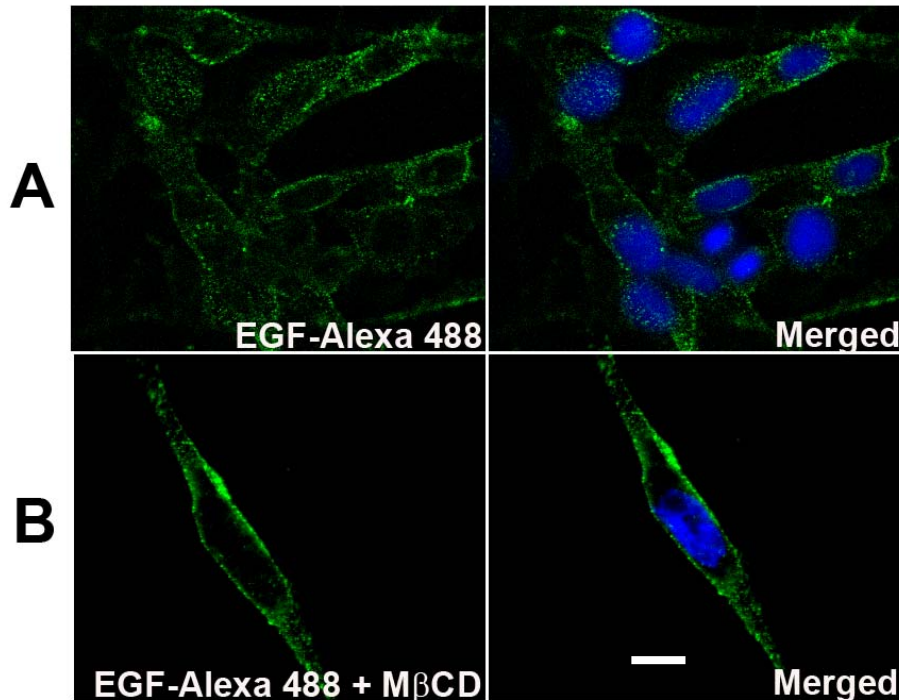


Figura 15: EGF não é detectado no núcleo de células tratadas com M β CD. A: SKHeP-1 estimuladas com EGF-alexa 488 por 10 minutos. B: SKHeP-1 tratadas com 5mM de M β CD e estimuladas com 200 ng/mL de EGF-488. Os núcleos foram marcados com Hoechst (azul). Essa figura é representativa de três experimentos independentes, com aproximadamente 40 imagens coletadas em cada um. Barra = 10 μ m.

4.7. O *knockdown* de caveolina inibe a translocação de EGFR para o núcleo

O papel das caveolas na translocação do EGFR para o núcleo, sugerido no experimento anterior, foi explorado através do *knockdown* de caveolina 1 (CAV1) por siRNA. A inibição da expressão de caveolina bloqueia a endocitose mediada por caveolas, pois elas são seu principal constituinte protéico (PARTON, 2003). O siRNA para CAV-1 foi testado, conforme demonstrado na Figura 16. Células SKHeP-1 transfectadas com 50nM desse siRNA tiveram 55% de redução na expressão de caveolina 1. O veículo utilizado para transfecção não alterou o nível de CAV-1 sozinho (Figura 16).

SKHeP-1 foram transfectadas com CAV-1 siRNA nas condições testadas anteriormente. 24 horas depois foram estimuladas com EGF-Alexa 488 e tiveram os núcleos marcados com anti-Lamina B1 e Hoechst. Células controle

não transfectadas foram também estimuladas e imunomarcadas. Imagens coletadas dessa imunofluorescência estão representadas na Figura 17. Na sobreposição das imagens do painel A, que representam células não transfectadas, observa-se co-localização de EGF-Alexa 488 com o núcleo. Em contrapartida, no grupo de células transfectadas no painel B a sobreposição das imagens não acusa EGF no núcleo. Nessa imagem é notável que o EGF-Alexa 488 está acumulado na periferia celular, sugerindo bloqueio da translocação do EGFR para o núcleo (Figura 17, painel B).

Para confirmar esse achado, células transfectadas com siRNA para CAV-1 foram estimuladas com EGF e submetidas a fracionamento celular para análise por western blot (Figura 18). Observa-se acúmulo de EGFR na fração não nuclear de células transfectadas e estimuladas com EGF (Figura 18b). Ainda nessas células, não houve aumento da quantidade desse receptor na fração nuclear; ao contrário, o nível de nEGFR caiu em células transfectadas e estimuladas com EGF (Figura 18a).

Em conjunto, esses dados sugerem que as caveolas são importantes para a translocação do EGFR para o núcleo.

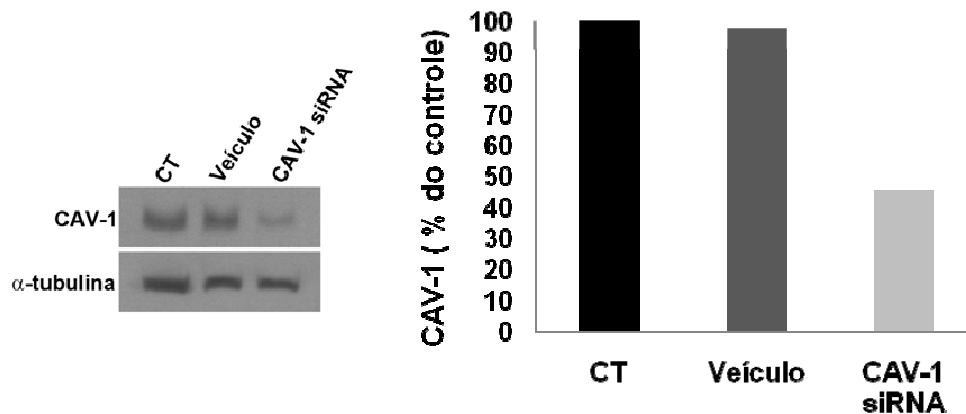


Figura 16: O siRNA para CAV-1 reduz a expressão de CAV-1. Células SKHep-1 foram transfectadas com 50 nM de CAV-1 siRNA utilizando 10ng/mL de Lipofectamina como veículo. CT = Células controle, não transfectadas. Veículo = Células incubadas apenas com 10 μ l de Lipofectamina. Após 24 horas foram extraídas proteínas totais dessas células. À esquerda: Western blot utilizando anticorpos anti-CAV-1 e anti- α -tubulina. À direita: Quantificação dos dados de Western blot normalizados com α -tubulina.

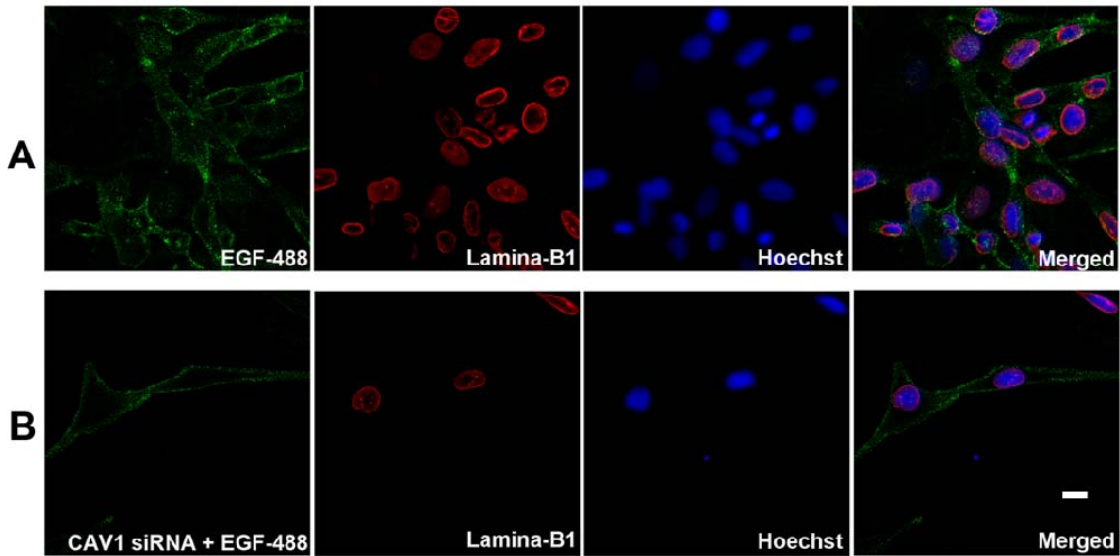


Figura 17: A translocação do EGFR para o núcleo é inibida em células transfectadas com CAV-1 siRNA. A: SKHep-1 estimuladas com 200 ng/mL de EGF-488 por 10 minutos. B: SKHep-1 transfectadas com 50 nM de CAV-1 siRNA e 10 μ l de Lipofectamina e estimuladas com 200 ng/mL de EGF-alexa 488. Os núcleos foram marcados com anti-Lamina B1 (vermelho) e Hoechst (azul). Essa figura é representativa de três experimentos independentes, com aproximadamente 40 imagens coletadas. Barra = 10 μ m.

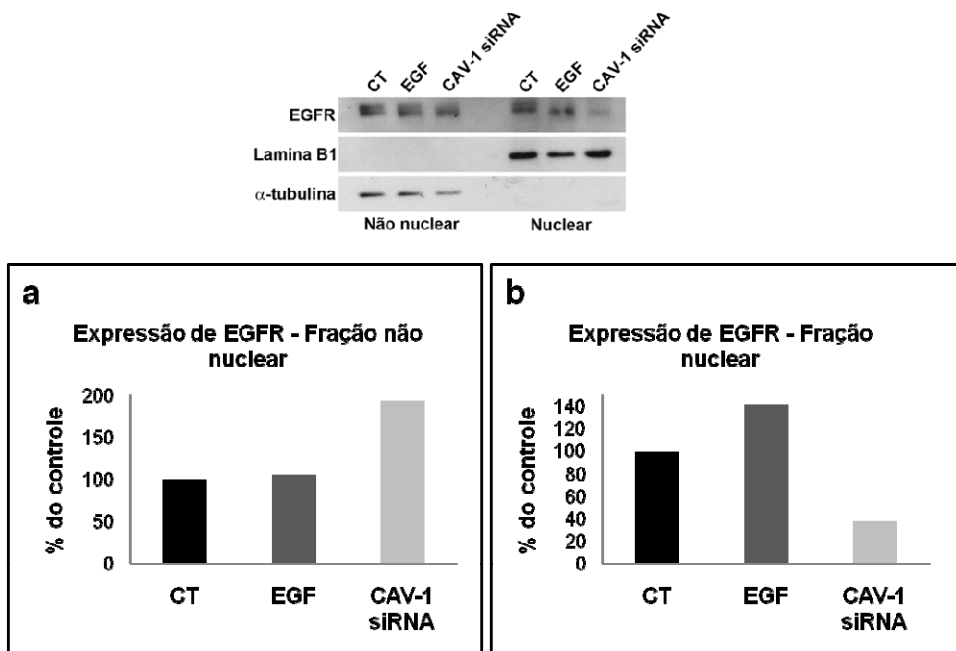


Figura 18: O knockdown de CAV-1 inibe a translocação do EGFR para o núcleo. Células SKHep-1 foram transfectadas com 50nM de CAV-1 siRNA, após 24 horas foram estimuladas com 200 ng/mL de EGF por 10 minutos e submetidas a fracionamento celular. CT = controle, células não transfectadas e não estimuladas. EGF = células não transfectadas e estimuladas com EGF. Painel superior: Western blot das frações não nuclear e nuclear utilizando anti-EGFR, anti-Lamina B1 e anti- α -tubulina. Essa figura é representativa de dois experimentos independentes. Gráficos: Quantificação dos dados de EGFR da fração não nuclear normalizados com α -tubulina (a) e nuclear normalizados com Lamina B1 (b), representando a média de dois experimentos independentes.

4.8. A maior parte do EGFR que é internalizado em resposta ao EGF não vai para lisossomos

É sugerido na literatura que o EGF e seu receptor são internalizados e, em seguida, degradados como mecanismo de regulação negativa da sinalização (SORKIN; GOH, 2008).

A sonda de lisossomos LysoTracker foi utilizada para avaliar se o EGFR é localizado nessa organela após ser internalizado. Células SKHep-1 foram incubadas com LysoTracker, estimuladas com EGF-Alexa 488 e incubadas com Hoechst para marcação do núcleo. As imagens representativas desse experimento estão na Figura 19. Na sobreposição das imagens (merged) há poucos pontos amarelos (cor resultante da sobreposição do verde com o vermelho) comparados aos verdes e vermelhos isolados. Logo, há pouca co-localização de EGF com lisossomos. É possível observar ainda na Figura 19 a presença de EGF no núcleo. Portanto, grande parte do EGF que é internalizado vai para o núcleo e poucos vão para lisossomos.

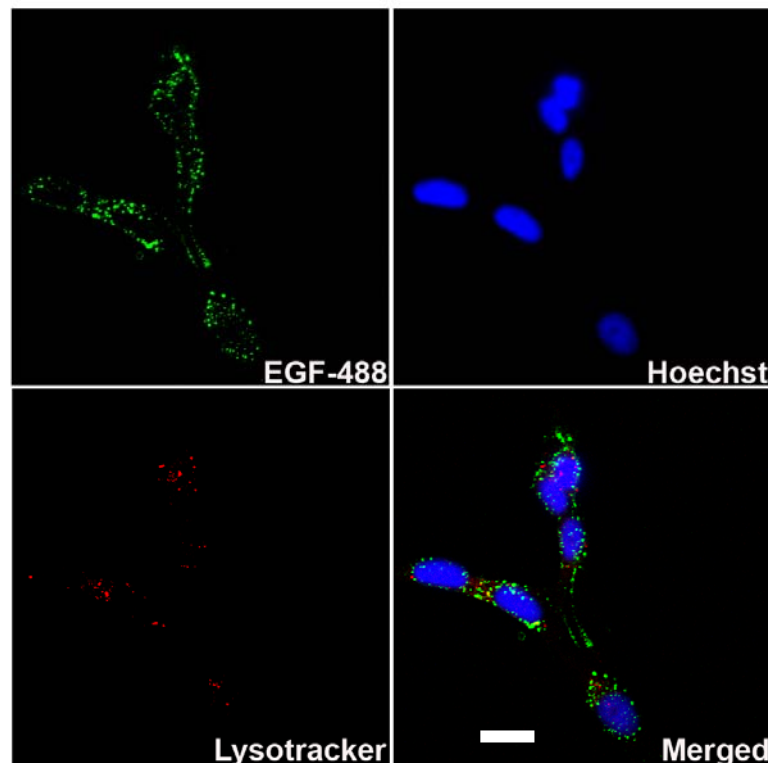


Figura 19: A maior parte do EGF não co-localiza com lisossomos em SKHep-1. Células foram incubadas com 400 nM de LysoTracker por 30 minutos, sendo nos 10 minutos finais incubadas com 200 ng/mL de EGF-alexa 488. Os núcleos dessas células foram marcados com Hoechst. Essa figura é representativa de 40 imagens coletadas. Barra = 10 μ m.

5. Discussão e Conclusões

A expressão de EGFR é um indicativo de malignidade para tumores de mama (GRIMAUX *et al.*, 1989; KOENDERS *et al.*, 1993; XUE *et al.*, 2006), cabeça e pescoço (DASSONVILLE *et al.*, 1993), pulmão (HIRSCH *et al.*, 2009), bexiga (NEAL *et al.*, 1990), pancreático (TOBITA *et al.*, 2003), cólon-retal (CUNNINGHAM *et al.*, 2005), carcinomas gástrico (YOSHIDA *et al.*, 1989) e hepatocelular (TANG *et al.*, 1998). Recentemente, a detecção desses receptores no núcleo celular de materiais de biópsia foi fortemente correlacionada com pior prognóstico para pacientes com câncer (LO *et al.*, 2005b; HOSHINO *et al.*, 2007) e reconhecida como fator causal na resistência à quimioterapia (LI *et al.*, 2009). O presente trabalho teve como objetivo estudar o mecanismo pelo qual o EGFR é translocado da superfície celular ao núcleo. A linhagem de células endoteliais derivadas de tumor hepático, SKHep-1, foi selecionada para esse estudo por expressar altos níveis de EGFR funcionais. Outras linhagens tumorais – MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB 231 – apresentaram menor expressão desse receptor (Figura 4) e, portanto, não foram utilizadas.

Através das técnicas de imunofluorescência e western blot foi demonstrado que o estímulo com EGF é capaz de induzir a internalização e a translocação nuclear do EGFR em células SKHep-1 (Figuras 7 e 9). A localização do EGFR no interior do núcleo foi confirmada com a reconstrução 3D de células estimuladas (Figura 8). No primeiro relato sobre o nEGFR, Marti *et al.* (1991) afirmaram que esse receptor encontra-se solúvel no nucleoplasma e não em associação com a membrana. Em contrapartida, nossos dados indicam que ele pode estar associado à membrana interna do envelope nuclear (Figura 8). Acreditamos que a estrutura do EGFR, com um domínio transmembrana hidrofóbico, seria incompatível com uma forma solúvel. Todavia, é necessário o uso de técnicas mais precisas para apurar a localização subnuclear desse receptor, bem como seu comportamento nesse compartimento.

A imunofluorescência na figura 7 mostra que EGF e EGFR são co-localizados tanto na região não nuclear como na nuclear. Esse dado, somado a outros descritos na literatura, indicam que o EGFR entra nas células complexado ao EGF (ZIDOVETZKI *et al.*, 1981; COHEN; FAVA, 1985). Além

disso, esse achado foi importante porque validou o uso do ligante como marcador da localização do receptor.

Contudo, existe a hipótese do EGF ser internalizado sem o EGFR. Há indícios de que ligantes exógenos entram nas células por endocitose (WILLINGHAM *et al.*, 1983) e são encontrados no núcleo (JOHNSON *et al.*, 1980; RAPER *et al.*, 1987; LI *et al.*, 1996). É sugerido que o EGF ative receptores diretamente no núcleo. Nas análises de western blot foram detectadas moléculas de EGFR nas frações não nucleares de células controles (Figuras 9, 14 e 18), o que indica presença de EGFR residual no núcleo, um possível alvo para os ligantes intracelulares. Essa hipótese é reforçada com a análise da translocação do pEGFR nas Figuras 9 c e d. Esses dados sugerem translocação do EGFR ativado, mas não descarta a possibilidade de ocorrer fosforilação diretamente no núcleo, pois a quantidade de pEGFR no citosol só começa a cair após 5 minutos de estímulo e, nesse tempo, a quantidade de pEGFR no núcleo já é acentuada. Novos experimentos são necessários para confirmação dessa hipótese e, caso confirmado, para avaliação dos fatores que influenciam a internalização do ligante e os mecanismos para ativação intranuclear.

Nesse trabalho não foi avaliado se ocorre translocação de receptores da membrana plasmática para o núcleo. Para isso seria necessária a biotinação das proteínas de superfície celular e conseqüente detecção do EGFR biotilado no núcleo. Todavia, esse processo foi demonstrado ocorrer com outro RTK, o receptor do fator de crescimento hepático (c-Met). Os c-Met total e ativado são translocados da membrana plasmática para o núcleo após ativação com seu ligante (GOMES *et al.*, 2008). Acreditamos que o mesmo ocorre com o EGFR.

As análises de western blot na figura 9 mostram que os níveis de EGFR aumentam no núcleo com 5 minutos de estímulo, atingindo o pico em 10 minutos. Ao mesmo tempo, ocorre decréscimo na quantidade desse receptor na fração não nuclear, o que reafirma que ele é translocado para o núcleo. A ausência de contaminação nas duas frações foi comprovada com a avaliação da expressão de α -tubulina e Lamina B1, que são expressas exclusivamente no citosol e no núcleo, respectivamente. Como mencionado anteriormente, a quantidade de pEGFR no núcleo também é crescente com o tempo de

estímulo, apresentando pico em 10 minutos. No entanto, o nível de pEGFR na fração não nuclear só começa a cair após 5 minutos de estímulo e essa queda não é acentuada como para o EGFR total. Como o estímulo com EGF é constante, acreditamos que alguns receptores permanecem na membrana sendo continuamente ativados. De fato, a sinalização citosólica via EGFR é sustentada, como pode ser observado pela fosforilação de Erk 1/2 (Figura 5). A quantidade de pErk 1/2 aumenta a partir de 1 minuto de estímulo com EGF e é crescente com o tempo. Com 10 minutos, ela continua sendo fosforilada, enquanto há grande quantidade de EGFR no núcleo. Essas observações levam à especulação de que a sinalização citosólica e nuclear do EGFR ocorrem paralelamente. Com efeito, há evidências que dão suporte à idéia de que o EGFR tem funções distintas dependendo da sua localização, como apresentado por Fox e Das (1979), mostrando que a síntese de DNA em cultura de fibroblastos requer a constante indução da internalização do EGFR pelo EGF, e não simplesmente sua ligação na superfície celular.

A quantidade de nEGFR total e fosforilado começa a decair após 10 minutos de estímulo. Esse achado corrobora com Lo *et al.* (2006), que mostraram que o nEGFR interage com a exportina CRM1 e dessa forma é exportado do núcleo. Ainda segundo esses autores, a interação entre EGFR e CRM1 é máxima no pico de translocação do EGFR. Portanto, com 10 minutos de estímulo com EGF a concentração de nEGFR é máxima e, em seguida, esses receptores são transportados para fora do núcleo.

Hepatócitos primários isolados de ratos saudáveis foram utilizados e apresentaram translocação nuclear de EGFR induzida por EGF. Esse receptor já havia sido descrito em núcleos de hepatócitos de fígado em regeneração (MARTI *et al.*, 1991). Todavia, o presente estudo evidencia a translocação do EGFR para o núcleo em células não tumorais e derivadas de tecidos normais. Assim, esse achado provê um indício de que o nEGFR tem funções fisiológicas e não ocorre apenas em condições patológicas ou em linhagens tumorais.

A relevância do presente trabalho é notada pelo fato de que nenhum estudo publicado até o momento mostrou diretamente qual via endocítica é responsável pela translocação do EGFR ao núcleo, embora o nEGFR tenha sido relatado há anos e sua contribuição na oncologia clínica seja evidente. O nEGFR é um alvo atraente para o tratamento de câncer e o conhecimento das

rotas que levam esse receptor ao compartimento nuclear pode fornecer estratégias interessantes para intervenção na progressão tumoral. O trabalho de Lo e colaboradores (2006) mostrou que a expressão transiente de dinamina K44A em células CHO reduz em 80% a expressão de nEGFR. No entanto, eles falharam em avaliar a via endocítica responsável pela internalização do receptor, já que a dinamina tem papel nas vias dependentes de clatrina e de caveolas (DAMKE *et al.*, 1994; HENLEY *et al.*, 1998). Nossos dados reafirmam o papel da dinamina na translocação do EGFR, a partir da observação de que o dominante negativo K44A bloqueia sua internalização (Figura 11).

Alguns autores assumem que a internalização do EGFR ocorre via endocitose dependente de clatrina; entretanto, não há evidências diretas que demonstrem esse mecanismo para a translocação nuclear desse receptor. Essa afirmação é, em geral, baseada no fato de que a interação da Grb2 com receptores é essencial para a endocitose mediada por clatrina (JIANG *et al.*, 2003). A Grb2 fornece sítios de ligação à proteínas Cbl, que ativam o processo de ubiquitinação de alguns RTKs, encaminhando-os aos lisossomos (DIKIC; GIORDANO, 2003). No entanto, EGFR mutante com ausência dos sítios de ligação para Grb2 e Cbl são internalizados normalmente em diferentes tipos celulares (CHEN *et al.*, 1989), sugerindo que a endocitose do EGFR é independente de Grb2. Contudo, a importância da via dependente de clatrina na internalização do EGFR não é ignorada. Um trabalho mostrou que a inibição específica dessa via endocítica reduz a concentração de EGFR em endossomos (HUANG *et al.*, 2004). No atual trabalho, o *knockdown* de CHC2 não resultou em redução do nEGFR em células estimuladas com EGF; ao contrário, a quantidade de EGFR foi maior na fração nuclear de células que expressaram menos CHC2 (Figura 13). Esse dado aponta que a endocitose mediada por clatrina não é importante para a translocação nuclear do EGFR. Entretanto, não descartamos a importância dessa via para a internalização e tráfego desse receptor para outros compartimentos intracelulares. Há demonstrações de que a via dependente de clatrina pode mediar o transporte do EGFR aos lisossomos (CHEN *et al.*, 1989). Assim, somado aos nossos dados que mostram que ela não é requerida para a localização nuclear desse receptor, algumas questões são colocadas em evidência, como: o EGFR pode ser internalizado por vias distintas dependendo do tipo celular ou do destino

final do receptor? Se sim, quais mecanismos selecionam o cargo endocítico e determinam a rota do EGFR? Nas células SKHep-1 estimuladas com EGF são encontrados receptores localizados em lisossomos e outros no núcleo (Figura 19). Contudo, há pouca sobreposição de EGF com lisossomos, indicando que a maior parte do receptor que é internalizado não entra em via de degradação proteolítica.

A inibição das estruturas envolvidas na endocitose mediada por balsas lipídicas e caveolas resultou em menores quantidades de nEGFR em células estimuladas com EGF (Figuras 14, 15, 17 e 18). Muitos receptores de superfície celular concentram-se em balsas lipídicas, que servem como plataforma para proteínas sinalizadoras e são importantes na transdução do sinal (SIMONS; IKONEN, 1997). As caveolas são estruturas que estão associadas a esses domínios e são capazes de selecionar cargos endocíticos, bem como servir de base para a formação de vesículas revestidas por caveolina (PARTON; RICHARDS, 2003). Muitos estudos mostraram direta ou indiretamente que o EGFR se concentra nesses microdomínios da membrana plasmática tanto em células não estimuladas como nas expostas ao EGF (MINEO *et al.*, 1996; ZHUANG *et al.*, 2002; MATVEEV; SMART, 2002; PIKE; HAN; GROSS, 2005). Há evidências também que o receptor fosforilado é recrutado às caveolas e interage diretamente com a CAV-1 (ABULROB *et al.*, 2004). Dentro dessas estruturas, o EGFR é capaz de recrutar seus alvos *downstream*, que co-localizam com a caveolina após ativação com EGF (JANG *et al.*, 2001; HAN *et al.*, 2002). Um dos alvos que é recrutado às caveolas após ativação do EGFR é a PLD, que já foi demonstrada ser importante na indução da endocitose dependente de dinamina de receptores (SHEN; XU; FOSTER, 2001; DU *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2009), sugerindo que esses microdomínios criam pontos de ancoragem para moléculas que interferem na internalização do receptor. A internalização do EGFR através dessas estruturas já havia sido reconhecida (SIGISMUND *et al.*, 2005). Um trabalho mostrou que a superexpressão de caveolinas resulta em acentuada internalização do EGFR (PARK *et al.*, 2000). O atual trabalho é o primeiro a demonstrar diretamente o papel da CAV-1 na translocação do EGFR para o núcleo.

Dados recentes apontaram que a CAV-1 reduz a ativação da cascata das MAPKs ativada por EGFR (HAN *et al.*, 2009), enquanto outros relatos

apontaram que esse receptor após ser internalizado por endocitose dependente de clatrina, é capaz de ativar a via das MAPKs em endossomos (DI GUGLIELMO *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 2002). Assim, mais uma vez é sugerido que as vias pelas quais o EGFR pode ser internalizado determinam funções distintas na sinalização.

Sigismund e colaboradores (2005) demonstraram que baixas concentrações de EGF (20 ng/mL) induzem a internalização do EGFR por via dependente de clatrina, enquanto altas concentrações desse ligante (100 ng/mL) estimulam a endocitose independente de clatrina e dependente de balsas lipídicas. No presente trabalho, a concentração de 100 a 200 ng/mL de EGF induziu a translocação nuclear do EGFR via balsas lipídicas/caveolas. Em conjunto esses dados indicam que a concentração de EGF pode influenciar o mecanismo de endocitose do EGFR que, por sua vez, determina seu destino intracelular. Assim, sugerimos que células expostas a grande quantidade de EGF internalizam o EGFR por via dependente de balsas lipídicas/caveolas e assim ele é translocado ao núcleo, ao passo que células expostas a menor quantidade de EGF internalizam o receptor por via dependente de clatrina, encaminhando-o a outros compartimentos intracelulares. Essa hipótese é condizente com o fato de que células tumorais dispõem de altas concentrações de ligantes (DE LARCO; TODARO, 1978; SALOMON *et al.*, 1995) e também apresentam altos níveis de nEGFR (LO *et al.*, 2005b). Além disso, há dados na literatura que poderiam fornecer mecanismos para a seleção da via endocítica pelos níveis de EGF como no caso da PLD: sabe-se que essa enzima é ativada pelo EGFR apenas em concentrações de EGF acima de 20 ng/mL e, portanto, o envolvimento da PLD na endocitose é dependente da concentração de EGF (LEE *et al.*, 2009). Iremos realizar novos experimentos para demonstrar a possível dependência da concentração de EGF na translocação do EGFR para o núcleo.

Conforme ressaltado por Wang *et al.* (2010), o destino do EGFR internalizado é decidido nos endossomos primários. É bem reportado que algumas toxinas, como a da cólera, são internalizadas principalmente por via dependente de caveolas e levadas primeiro para o Golgi e depois ao retículo endoplasmático, de onde são transportadas ao citosol através da ação do translocador sec61 (SANDVIG; VAN DEURS, 2002). Liao e Carpenter (2007)

assumem que o mecanismo de transporte intracelular do EGFR é semelhante ao que ocorre com certas toxinas. Eles demonstraram que após o estímulo com EGF parte dos receptores é concentrada no retículo endoplasmático, onde se associam com a sec61 β e são retrotranslocados para o citosol. Ainda segundo esses autores, esse processo é importante para a localização nuclear do EGFR. O receptor liberado pela sec61 β fica disponível para interagir com a importina β 1, que medeia seu transporte ao interior do núcleo (LO *et al.*, 2006). Nesse processo ainda há muitas lacunas a serem preenchidas. Não é esclarecido, por exemplo, como o receptor que contém um domínio hidrofóbico ficaria solúvel no citosol.

Em suma, nossos dados mostram que a translocação do EGFR para o núcleo é dependente da endocitose mediada por dinamina e balsas lipídicas/caveolas, e não por via dependente de clatrina.

Contudo, muitas perguntas permanecem não respondidas, como o que (quais moléculas) determina a internalização, a maquinaria envolvida na triagem dos receptores nas caveolas e as rotas intracelulares envolvidas no transporte do receptor ao núcleo.

Como perspectivas, esperamos dar continuidade à investigação sobre o mecanismo de transporte do EGFR ao núcleo através da identificação de outras proteínas importantes no processo de internalização, identificação de estruturas intracelulares pelo qual o receptor trafega e dos mecanismos de transporte pelo envelope nuclear. Temos ainda como perspectivas a abordagem de aspectos funcionais do nEGFR, onde buscaremos novos alvos nucleares desse receptor e possíveis vias que podem ser ativadas no núcleo.

6. Referências bibliográficas

- ABULROB, A. *et al.* Interactions of EGFR and caveolin-1 in human glioblastoma cells: evidence that tyrosine phosphorylation regulates EGFR association with caveolae. **Oncogene**, v. 23, n. 41, p. 6967-6979, 2004.
- ARTEGA, C. L. EGF receptor as a therapeutic target: patient selection and mechanisms of resistance to receptor-targeted drugs. **Journal of clinical oncology**, v. 21, p. 5289-5291, 2003.
- BASELGA, J. The EGFR as a target for anticancer therapy – focus on cetuximab. **European journal of cancer**, v. 37, p. 516-522, 2001.
- BEGUINOT, L. *et al.* Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes. **Proceedings of the national academy of sciences of the U.S.A.**, v. 81, n. 8, p. 2384-2388, 1984.
- BELSCHES, A. P. *et al.* Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 2, p. 501-518, 1997.
- BEVAN, A. P. *et al.* Intracellular signal transduction: the role of endosomes. **Trends in endocrinology and metabolism**, v. 7, n. 1, p. 13-21, 1996.
- BIANCO, R. *et al.* Intrinsic and acquired resistance to EGFR inhibitors in human cancer therapy. **Endocrine-related cancer**, v. 12, p. 5159-5171, 2005.
- BLIEK, A. M. V. D. *et al.* Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. **Journal of cell biology**, v. 122, n. 3, p. 553-563, 1993.
- BONO, J. S.; ROWINSKY, E. K. The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. **Trend in molecular medicine**, v. 8, n. 4, p. 519-526, 2002.
- BOYER, J. L. *et al.* Preparation and specific applications of isolated hepatocyte couplets. **Methods in enzymology**, v. 192, p. 501-516, 1990.
- BRODSKY, F. M. *et al.* Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 17, p. 517-568, 2001.
- BURGESS, A. W. *et al.* An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. **Molecular cell**, v. 12, n. 3, p. 541-552, 2003.
- CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, p. 1655-1657, 2002.

CARPENTER, G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. **Current opinion in cell biology**, v. 15, p. 143-148, 2003.

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

CARR, J. F.; HINSHAW, J. E. Dynamin assembles into spirals under physiological salt conditions upon the addition of GDP and gamma-phosphate analogues. **Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 44, p. 28030-28035, 1997.

CERESA, B. P. *et al.* Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 7, p. 3862-3870, 1998.

CERESA, B. P.; SCHMID, S. L. Regulation of signal transduction by endocytosis. **Current opinion in cell biology**, v. 12, p. 204-210, 2000.

CHADDA, R. *et al.* Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. **Traffic**, v. 8, n. 6, p. 702-717, 2007.

CHEN, W. S. *et al.* Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand-induced internalization and calcium regulation. **Cell**, v. 59, n. 1, p. 33-43, 1989.

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

COHEN, S.; FAVA, R. A. Internalization of functional epidermal growth factor : receptor/kinase complexes in A-431 cells. **Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 22, p. 12351-12358, 1985.

CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, v. 422, p. 37-44, 2003.

CORREA, C. R. *et al.* Establishment and characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer. **Oncology research**, v. 17, n. 10, p. 473-482, 2009.

CUNNINGHAM, M. P. *et al.* Coexpression, prognostic significance and predictive value of EGFR, EGFRvIII and phosphorylated EGFR in colorectal cancer. **International journal of oncology**, v. 27, n. 2, p. 317—325, 2005.

- DAMKE, H. *et al.* Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. **Journal of cell biology**, v. 127, n. 4, p. 915-934, 1994.
- DASSONVILLE, O. *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 11, n. 10, p. 1873-1878, 1993.
- DE LARCO, J. E.; TODARO, G. J. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. **Proceedings of the national academy of sciences of the U.S.A.**, v. 75, n. 8, p. 4001-4005, 1978.
- DEMORY, M. L. *et al.* Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria. **Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 52, p. 36592-36604, 2009.
- DI GUGLIELMO, G. M. *et al.* Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. **EMBO journal**, v. 13, n. 18, p. 4269-4277, 1994.
- DIKIC, I.; GIORDANO, S. Negative receptor signaling. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 2, p. 128-135, 2003.
- DITTMANN, K.; MAYER, C.; RODEMANN, H. P. Nuclear EGFR as novel therapeutic target. **Strahlentherapie und onkologie**, v. 186, p. 1-6, 2010.
- DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. Mechanisms of endocytosis. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 857-902, 2009.
- DONALDSON, J. G.; KLAUSNER, R. D. ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. **Current opinion in cell biology**, v. 6, n. 4, p. 527-532, 1994.
- DOWNWARD, J. *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. **Nature**, v. 307, p. 521-527, 1984.
- DU, G. *et al.* Phospholipase D2 localizes to the plasma membrane and regulates angiotensin II receptor endocytosis. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 3, p. 1024-1030, 2004.
- DUNPHY, J. L. *et al.* The Arf6 GEF GEP100/BRAG2 regulates cell adhesion by controlling endocytosis of beta1 integrins. **Current biology**, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2006.

FANG, Y. *et al.* Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. **Science**, v. 294, p. 1942-1945, 2001.

FOX, C. F.; DAS, M. Internalization and processing of the EGF receptor in the induction of DNA synthesis in cultured fibroblasts: the endocytic activation hypothesis. **Journal of supramolecular structure**, v. 10, n. 2, p. 199-214, 1979.

FREDERICK, L. *et al.* Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. **Cancer research**, v. 60, n. 5, p. 1383-1387, 2000.

GADELLA, T. W.; JOVIN, T. M. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. **Journal of cell biology**, v. 129, n. 6, p. 1543-1558, 1995.

GOMES, D. A. *et al.* C-met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. **Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 7, p. 4344-4351, 2008.

GOSPODAROWICZ, D. Epidermal and nerve growth factors in mammalian development, **Annual review of physiology**, v. 43, p. 251-263, 1981.

GRIMAUX, M. *et al.* Prognostic value of epidermal growth factor receptor in node-positive breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 14, n. 1, p. 77-90, 1989.

GSCHWIND, A. *et al.* The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. **Nature reviews Cancer**, v. 4, p. 361-370, 2004.

GULLICK, W. J. A new model for the interaction of EGF-like ligands with their receptors: the new one-two. **European journal of cancer**, v. 30, n. 14, p. 2186, 1994.

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. **Journal of cell biology**, v. 81, n. 2, p. 382-395, 1979.

HAILSTONES, D. *et al.* Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. **Journal of lipid research**, v. 39, p. 369-379, 1998.

HAN, F. *et al.* Caveolin-1 acts as a tumor suppressor by down-regulating epidermal growth factor receptor-mitogen-activated protein kinase signaling

pathway in pancreatic carcinoma cell lines. **Pancreas**, v. 38, n. 7, p. 766-774, 2009.

HAN, J. M. *et al.* Localization of phospholipase D1 to caveolin-enriched membrane via palmitoylation: implications for epidermal growth factor signaling. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 11, p. 3976-3988, 2002.

HANADA, N. *et al.* Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. **Molecular carcinogenesis**, v. 45, n. 1, p. 10-17, 2006.

HARRIS, R. C. *et al.* EGF receptor ligands. **Experimental cell research**, v. 284, p. 2-13, 2003.

HASHIMOTO, A. *et al.* Shc regulates epidermal growth factor-induced activation of the JNK signaling pathway. **Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20139-20143, 1999.

HENLEY, J. R. *et al.* Dynamin-mediated internalization of caveolae. **Journal of cell biology**, v. 141, n. 1, p. 85-99, 1998.

HERBST, J. J. *et al.* Regulation of postendocytic trafficking of the epidermal growth factor receptor through endosomal retention. **Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 17, p. 12865-12873, 1994.

HINSHAW, J. E. Dynamin and its role in membrane fission. **Annual review in cell and developmental biology**, v. 16, p. 483-519, 2000.

HIRSCH, F. R. *et al.* Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. **Oncogene**, v. 28, p. 532-537, 2009.

HOLLER, D.; VOLAREVIC, S.; DIKIC, I. Compartmentalization of growth factor receptor signaling. **Current opinion in cell biology**, v. 17, p. 107-111, 2005.

HOSHINO, M. *et al.* Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Pathobiology**, 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, F. *et al.* Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. **Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 16, p. 16657-16661, 2004.

HUNG, L. Y. *et al.* 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.

HYNES, N. E.; LANE, H. A. ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. **Nature reviews cancer**, v. 5, p. 341-354, 2005.

JANG, I. H. *et al.* Localization of phospholipase C-gamma 1 signaling in caveolae: importance in EGF-induced phosphoinositide hydrolysis but not in tyrosine phosphorylation. **FEBS letters**, v. 491, p. 4-8, 2001.

JIANG, X. *et al.* Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. **Molecular biology of the cell**, v. 14, n. 3, p. 858-870, 2003.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by Erk, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, p. 1911-1912, 2002.

JOHNSON, G. L.; VAILLANCOURT, R. R. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. **Current opinion in cell biology**, v. 6, n. 2, p. 230-238, 1994.

JOHNSON, L. K. *et al.* Nuclear accumulation of epidermal growth factor in cultured rat pituitary cells. **Nature**, v. 287, p. 340-343, 1980.

JORISSEN, R. N. *et al.* Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. **Experimental cell research**, v. 284, p. 31-53, 2003.

KAMAT, A.; CARPENTER, G. Phospholipase C- γ 1: Regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction. **Cytokine and growth factor reviews**, v. 8, n. 2, p. 109-117, 1997.

KANG, Y. S. *et al.* Clathrin-independent internalization of normal cellular prion protein in neuroblastoma cells is associated with the Arf6 pathway. **Journal of cell science**, v. 122, p. 4062-4069, 2009.

KATO, Y. *et al.* BmK1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor receptor. **Nature**, v. 395, p. 713-716, 1998.

KIL, S. J.; CARLIN, C. EGF receptor residues leu(679), leu(680) mediate selective sorting of ligand-receptor complexes in early endosomal compartments. **Journal of cellular physiology**, v. 185, n. 1, p. 47-60, 2000.

KOENDERS, P. G. *et al.* Epidermal growth factor receptor and prognosis in human breast cancer: a prospective study. **Breast cancer research and treatment**, v. 25, n. 1, p. 21-27, 1993.

LAX, I. *et al.* Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse cells, and differentiation binding of EGF and transforming growth factor alpha. **Molecular and cellular biology**, v. 8, n. 5, p. 1970-1978, 1988.

LEE, C. S. *et al.* The roles of phospholipase D in EGFR signaling. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1791, p. 862-868, 2009.

LI, C. *et al.* Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. **Oncogene**, v. 28, n. 43, p. 3801-3813, 2009.

LI, W. *et al.* Heregulin is rapidly translocated to the nucleus and its transport is correlated with c-myc induction in breast cancer cells. **Oncogene**, v. 12, p. 2473-2477, 1996.

LIAO, H. J.; CARPENTER, G. Cetuximab/C225-induced intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor. **Cancer research**, v. 69, n. 15, p. 6179-6183, 2009.

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, p. 1064-1072, 2007.

LIN, S. Y. *et al.* Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. **Nature cell biology**, v. 3, p. 802-808, 2001.

LO, H. W. *et al.* Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 1, p. 338-348, 2005b.

LO, H. W. *et al.* Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. **Cancer cell**, v. 7, p. 575-589, 2005a.

LO, H. W. *et al.* Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin β 1 and CRM1. **Journal of biological chemistry**, v. 98, p. 1570-1583, 2006.

LO, H. W.; HUNG, M. C. 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, p. 184-188, 2006.

- LOWENSTEIN, E. J. *et al.* The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptors tyrosine kinases to ras signaling. **Cell**, v. 70, n. 3, p. 431-442, 1992.
- MARTI, U. *et al.* Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocytes nuclei. **Hepatology**, v. 13, n. 1, p. 15-20, 1991.
- MARTI, U. *et al.* Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. **Thyroid**, v. 11, n. 2, p. 137-145, 2001.
- MARTÍN-NIETO, J.; VILLALOBO, A. The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site. **Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 227-236, 1998.
- MATVEEV, S. V.; SMART, E. J. Heterologous desensitization of EGF receptors and PDGF receptors by sequestration in caveolae. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 282, n. 4, p. c935-946, 2002.
- MAYOR, S.; PAGANO, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 8, p. 603-612, 2007.
- MCCLELLAN, M. *et al.* Regulation of proliferation and apoptosis by epidermal growth factor and protein kinase C in human ovarian surface epithelial cells. **Experimental cell research**, v. 246, n. 2, p. 471-479, 1999.
- MCPHERSON, P. S. Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis. **Cellular signaling**, v. 11, n. 4, p. 229-238, 1999.
- MCPHERSON, P. S.; KAY, B. K.; HUSSAIN, N. K. Signaling on the endocytic pathway. **Traffic**, v. 2, p. 375-384, 2001.
- METTLEN, M. *et al.* Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. **Biochemical society transactions**, v. 37, p. 1022-1026, 2009.
- MIACZYNSKA, M. *et al.* APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. **Cell**, v. 116, n. 3, p. 445-456, 2004.
- MILLER, K. *et al.* Localization of the epidermal growth factor (EGF) receptor within the endosome of EGF-stimulated epidermoid carcinoma (A431) cells. **Journal of cell biology**, v. 102, p. 500-509, 1986.

- MINEO, C. *et al.* Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. **Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 20, p. 11930-11935, 1996.
- MORIKI, T. *et al.* Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrana domain. **Journal of molecular biology**, v. 311, n. 5, p. 1011-1026, 2001.
- MOSCATELLO, D. K. *et al.* Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. **Cancer research**, v. 55, n. 23, p. 5536-5539, 1995.
- NEAL, D. E. *et al.* The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. **Cancer**, v. 65, n. 7, p. 1619-1625, 1990.
- NI, C. Y. *et al.* γ -secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor kinase. **Science**, v. 294, p. 2179-2181, 2001.
- NORMANNO, N. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, p. 2-16, 2006.
- NORMANNO, N. *et al.* The role of EGF-related peptides in tumor growth. **Frontiers in biosciences: a journal and virtual library**, v. 6, p. 685-707, 2001.
- OFFTERDINGER, M. *et al.* c-erbB3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. **Journal of cell biology**, v. 157, n. 6, p. 929-939, 2002.
- OGISO, H. *et al.* Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 775-787, 2002.
- OLAYIOYE, M. A. *et al.* ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by src tyrosine kinases. **Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 24, p. 17209-17218, 1999.
- ÖSTMAN, A.; BÖHMER, F. D. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. **Trends in cell biology**, v. 11, n. 6, p. 258-266, 2001.
- PARK, W. Y. *et al.* Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. **Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 27, p. 20847-20852, 2000.
- PARTON, R. G. Caveolae – from ultrastructure to molecular mechanisms. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 4, n. 2, p. 162-167, 2003.

PARTON, R. G.; RICHARDS, A. A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. **Traffic**, v. 4, p. 724-738, 2003.

PIKE, L. J.; HAN, X.; GROSS, R. W. Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids. **Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 29, p. 26796-26804, 2005.

PLANQUE, N. Nuclear trafficking of secreted factors and cell-surface receptors: new pathways to regulate cell proliferation and differentiation, and involvement in cancers. **Cell communication and signaling**, v. 4, p. 1-18, 2006.

PRENZEL, N. *et al.* The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. **Endocrine-related cancer**, v. 8, p. 11-31, 2001.

PSYRRI, A. *et al.* Correlates and determinants of nuclear epidermal growth factor receptor content in an oropharyngeal cancer tissue microarray. **Cancer epidemiology, biomarkers and prevention**, v. 17, n. 6, p. 1486-1492, 2008.

QUALMANN, B.; MELLOR, H. Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. **Biochemical journal**, v. 371, p. 233-241, 2003.

QUESNELLE, K. M. *et al.* STAT-mediated EGFR signaling in cancer. **Journal of cellular biochemistry**, v. 102, p. 311-319, 2007.

RAPER, S. E. *et al.* Translocation of epidermal growth factor to the hepatocyte nucleus during rat liver regeneration. **Gastroenterology**, v. 92, p. 1243-1250, 1987.

SAKO, Y. *et al.* Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. **Nature cell biology**, v. 2, n. 3, p. 168-172, 2000.

SALIM, K. *et al.* Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. **EMBO journal**, v. 15, n. 22, p. 6241-6250, 1996.

SALOMON, D. S. *et al.* Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 19, p. 183-232, 1995.

SANDVIG, K.; VANDEURS, B. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. **FEBS letters**, v. 529, n. 1, p. 49-53, 2002.

- SASAOKA, T. *et al.* The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. **Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 51, p. 32621-32625, 1994.
- SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 103, p. 211-225, 2000.
- SHEN, Y.; XU, L.; FOSTER, D. A. Role for phospholipase D in receptor-mediated endocytosis. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 2, p. 595-602, 2001.
- SIGISMUND, S. *et al.* Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. **Proceedings of the national academy of sciences of the U.S.A.**, v. 102, n. 8, p. 2760-2765, 2005.
- SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v. 387, p. 569-572, 1997.
- SORKIN, A. Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort. **Current opinion in cell biology**, v. 16, p. 392-399, 2004.
- SORKIN, A.; GOH, L. K. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. **Experimental cell research**, v. 314, n. 17, p. 3093-3196, 2008.
- SPRENGER, R. R. Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 25, n. 1, p. 156-172, 2004.
- STAMOS, J. *et al.* Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. **Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46265-46272, 2002.
- STORMS, R. W. BOSE, H. R. Jr. Oncogenes, protooncogenes, and signal transduction: toward a unified theory? **Advances in virus research**, v. 37, p. 1-34, 1989.
- STOSCHECK, C. M.; CARPENTER, G. Down regulation of epidermal growth factor receptors: direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts. **Journal of cell biology**, v. 98, n. 3, p. 1048-1053, 1984.
- STOVER, D. R. *et al.* Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at a novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha. **Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 26, p. 15591-15597, 1995.

SUN, L.; CARPENTER, G. Epidermal growth factor activation of NF-kappaB is mediated through IkappaB alpha degradation and intracellular free calcium. **Oncogene**, v. 16, p. 2095-2192, 1998.

TANG, Z. *et al.* Alterations of oncogenes, tumor suppressor genes and growth factors in hepatocellular carcinoma: with relation to tumor size and invasiveness. **Chinese medical journal**, v. 111, n. 4, p. 313-318, 1998.

TOBITA, K. *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: significance for liver metastasis. **International journal of molecular medicine**, v. 11, n. 3, p. 305-309, 2003.

TONG, J. *et al.* Epidermal growth factor receptor phosphorylation sites Ser991 and Tyr998 are implicated in the regulation of receptor endocytosis and phosphorylations at Ser1039 and Thr1041. **Molecular and cellular proteomics**, v. 8, n. 9, p. 2131-2144, 2009.

TUMA, P. L. *et al.* Activation of dynamin GTPase by acidic phospholipids and endogenous rat brain vesicles. **Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 23, p. 17240-17246, 1993.

ULLRICH, A. *et al.* Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. **Nature**, v. 309, 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.

WALSENG, E.; BAKKE, O.; ROCHE, P. A. Major histocompatibility complex class II-peptide complexes internalize using a clathrin- and dynamin-independent endocytosis pathway. **Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14717-14727, 2008.

WANG, S. C. *et al.* Tyrosine-phosphorylation controls PCNA function through protein stability. **Nature cell biology**, v. 8, n. 12, p. 1359-1368, 2006.

WANG, Y. *et al.* Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 20, p. 7279-7290, 2002.

WANG, Y. N. *et al.* Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. **Oncogene**, v. 29, n. 28, p. 3997-4006, 2010.

WANNER, G. *et al.* Activation of protein kinase C epsilon stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor nuclear accumulation. **Radiotherapy and oncology**, v. 86, n. 3, p. 383-390, 2008.

WARD, C. W. *et al.* Insulin and epidermal growth factor receptors contain the cysteine repeat motif found in the tumor necrosis factor receptor. **Proteins**, v. 22, n. 2, p. 141-153, 1995.

WELLS, A. EGF receptor. **International journal of biochemistry and cell biology**, v. 31, p. 637-643, 1999.

WELLS, A.; MARTI, U. Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? **Nature reviews molecular cell biology**, v. 3, p. 1-6, 2002.

WILEY, H. S.; BURKE, P. M. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. **Traffic**, v. 2, p. 12-18, 2001.

WILLINGHAM, M. C. *et al.* The morphologic pathway of binding and internalization of epidermal growth factor in cultured cells. Studies on A431, KB, and 3T3 cells, using multiple methods of labeling. **Experimental cell research**, v. 46, n. 1, p. 163-175, 1983.

XIA, L. *et al.* Identification of both positive and negative domains within the epidermal growth factor COOH-terminal region for signal transducer and activator of transcription (STAT) activation. **Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30716-30723, 2002.

XIA, W. *et al.* Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. **Molecular carcinogenesis**, v. 48, n. 7, p. 610-617, 2009.

XIE, Y.; HUNG, M. C. Nuclear localization of p185 NEU tyrosine kinase and its association with transcriptional transactivation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 203, n. 3, p. 1589-1598, 1994.

XUE, C. *et al.* Epidermal growth factor receptor overexpression results in increased tumor cell motility in vivo coordinately with enhanced intravasation and metastasis. **Cancer research**, v. 66, n. 1, p. 192-197, 2006.

YAMADA, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. **Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 1, n. 5, p. 445-458, 1955.

YAMAMOTO, H. *et al.* Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. **Lung cancer**, v. 63, p. 315-321, 2009.

YOSHIDA, K. *et al.* Amplification of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and oncogenes in human gastric carcinomas. **Virchows Archiv. B.**, v. 57, n. 5, p. 285-290, 1989.

ZHANG, L. *et al.* Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. **Cancer research**, v. 62, n. 8, p. 2227-2231, 2002.

ZHANG, Y. *et al.* Cell surface TrK receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. **Journal of neurosciences**, v. 20, n. 15, p. 5671-5678, 2000.

ZIDOVETZKI, R. *et al.* 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 of the U.S.A.**, v. 78, n. 11, p. 6981-6985, 1981.