

Carolina de Andrade

**Efeito dos ligantes do Receptor do Fator de Crescimento  
Epidermal (EGFR) para sua translocação nuclear**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Fevereiro de 2015

Carolina de Andrade

**Efeito dos ligantes do Receptor do Fator de Crescimento  
Epidermal (EGFR) para sua translocação nuclear**

Dissertação de mestrado 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

Coorientadora: Dra. Jerusa Araújo Quintão  
Arantes Faria

Belo Horizonte

2015

Esse trabalho foi realizado com o suporte financeiro das agências:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.
  
- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brasil.
  
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.
  
- National Institutes of Health (NIH), EUA.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

## AGRADECIMENTOS

Ao professor **Dawidson A. Gomes** por todo conhecimento dividido durante esses anos de trabalho, orientação, incentivo e confiança em meu trabalho. Obrigada por contribuir com meu crescimento profissional.

Ao professor **Alfredo M. Goes** pelo exemplo de pessoa e profissional que inspira a todos.

Aos membros da banca **Jader Santos Cruz, Maria Cássia Ferreira de Aguiar e Carolina Cavaliéri Gomes** por aceitarem o convite da avaliação deste trabalho.

À minha amiga e co-orientadora **Jerusa A Quintão**, sem a qual este trabalho não seria concluído. Agradeço pela bela amizade que construímos, e por sempre estar prestativa em me ajudar. Palavras não resumirão minha profunda gratidão a você.

Aos amigos de laboratório mais que especiais, **Marcelo** (continue sendo esse príncipe!), **Marianna** (que sorte eu ter te conhecido!), **Andrea** (a louca mais amada!) e **Mariane** (Gimenez me diverte!) cuja convivência alegrou todos os meus dias, e que sempre estiveram dispostos a me ajudar em cada experimento, em cada dúvida e em cada lamentação (rs)! Quero levar vocês comigo pra sempre!

Aos colegas de laboratório que já não estão mais presentes, **Carolina Melo** com sua calma e sabedoria e ao **Arthur**, por ser um ser tão legal! À **Ana Carolina de Angelis**, por iniciar tão belamente este projeto e me ensinar grande parte do meu conhecimento científico e à **Mariana Brandão** por compartilhar muitos experimentos. À grande amiga **Natássia Corrêa**, diariamente ao meu lado, obrigada pela amizade, pelo ombro amigo e por sempre me ouvir.

Aos demais amigos do LICM: Betinha, Cíntia, Carol Reis, Ana Cláudia (obrigada pela companhia!!), Matheus, Juliana, Alessandra, Alexandra, Thaís,

Marina, Cris, Michele, Elis, Eliza, Pedro, Lílian, Estefânia, Ludmila, Junnia, Priscila, Joyce, Pablo, Catherine, Aline, Pricila. Vocês sempre tornam meu dia mais especial!

Aos amigos de graduação, **Tiago, Verônica, Vinícius e Isabel**, que quero guardar pra sempre e levar vocês no meu coração.

Ao médico **Dr. Jorge Luís Diogo**, pelo pronto atendimento em minhas necessidades e por também ter sido fundamental para que este trabalho pudesse ser concluído.

Ao **Eduardo**, pois sua presença foi fundamental. Sem você todos os dias seriam mais difíceis. Obrigada por cuidar de mim todos os dias e sempre estar ao meu lado, me ensinando e me incentivando. À **Cida e Dormans**, por sempre me incluírem em suas orações.

Um agradecimento especial aos meus pais, **Roberto e Eliana**, e ao meu irmão **Rafael** pelo incentivo, cuidado e por sempre estarem ao meu lado em minhas escolhas.

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

À **CAPES, Fapemig, NIH e CNPq** pelo suporte financeiro.

Agradeço a **Deus** por se colocar em meu caminho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>I. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>I</b>
<b>II. LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>III. LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1. O RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGFR).....	12
1.2. VIAS DE SINALIZAÇÃO MEDIADAS POR EGFR.....	16
1.3. A LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DO EGFR.....	18
1.4. OS LIGANTES DE EGFR.....	22
1.5. ATIVAÇÃO DO EGFR E MARCAS DE FOSFORILAÇÃO NA CTD.....	28
1.6. JUSTIFICATIVA.....	30
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1. CULTURA CELULAR.....	35
3.2. ESTÍMULO COM OS LIGANTES DE EGFR.....	35
3.3. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	35
3.4. FRACIONAMENTO CELULAR.....	36
3.5. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	36
3.6. <i>WESTERN BLOT</i> .....	36
3.7. CÁLCULO DOS VALORES DE $EC_{50}$ .....	39
3.8. ENSAIO DE MIGRAÇÃO ( <i>SCRATCH ASSAY/ WOUND HEALING</i> ).....	39
3.9. ENSAIO CLONOGÊNICO.....	40
3.10 ENSAIO DE CRESCIMENTO.....	40
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>4.RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
4.1. O EGFR TRANSLOCA PARA O NÚCLEO DE CÉLULAS SKHEP-1 APÓS ESTÍMULO COM EGF, HB-EGF, B-CELULINA E TGF-A.....	43
4.2. OS LIGANTES EGF, HB-EGF, B-CELULINA E TGF-A POSSUEM DIFERENTES VALORES DE $EC_{50}$ .....	47
4.3. O EGFR NÃO TRANSLOCA PARA O NÚCLEO APÓS ESTÍMULO COM ANFIREGULINA E EPIREGULINA.....	48
4.4. OS LIGANTES DE EGFR INDUZEM A FOSFORILAÇÃO DIFERENCIAL NOS RESÍDUOS DA CAUDA CARBOXITERMINAL DO EGFR.....	51

4.5. OS LIGANTES DE EGFR NÃO INDUZEM A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS NAS CÉLULAS SKHEP-1 .....	54
4.6. OS LIGANTES DE EGFR INDUZEM A MIGRAÇÃO CELULAR APÓS “FERIDA” COM EFICIÊNCIAS DISTINTAS.....	55
4.7. OS LIGANTES DE EGFR NÃO ALTERAM A TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS SKHEP-1 .....	59
<b>5.DISSCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>6.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>76</b>
<b>7.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>



## I. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL	<i>ABL proto-oncogene 1</i> (proto-oncogene de ABL 1)
AKT	<i>Protein kinase B</i> (proteína cinase B)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de Culturas Tipo Americana)
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (adenosina trifosfato)
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i> (proteína de resistência do câncer de mama)
B-MYB	<i>b-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog</i> (oncogene viral da proteína homóloga aviária b-myb)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovina)
cDNA	DNA complementar
C-MYC	<i>c-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog protein</i> (oncogene viral da proteína homóloga aviária)
CTD	<i>Carboxi-terminal domain</i> (cauda carboxi-terminal)
DAG	<i>Dyacylglycerol</i> (diacilglicerol)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (meio de cultura modificado de Dulbecco)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxorribonucléico)
DNAPK	<i>DNA-dependent protein kinase</i> (proteína cinase dependente de DNA)
DTT	<i>Dithiothreitol</i> (ditiotreitól)
E2F1	<i>E2F1 transcription factor</i> (fator de transcrição E2F1)
EC <sub>50</sub>	<i>Half maximal efective concentration</i> (metade da concentração efetiva máxima)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> (quimioluminescência intensificada)
EDTA	ácido N,N,N',N'-etilenodiaminotetracético
ELK-1	<i>ETS domain-containing protein Elk-1</i> (proteína que contém o domínio ETS)
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epidermal)

EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (receptor do fator de crescimento epidermal)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> (cinase regulada por estímulos extracelulares)
ErbB	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (receptor do fator de crescimento epidermal)
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> (proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento)
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i> (guanosina trifosfato)
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i> (fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina)
HER	<i>Human EGF receptor</i> (receptor humano de EGF)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INM	<i>Inner nuclear membrane</i> (membrana nuclear interna)
iNos	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (óxido nítrico sintase induzida)
InsP3	<i>Inositol 1,4,5-triphosphate</i> (inositol 1,4,5-trifosfato)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteínas cinases ativadas por mitogêno)
mRNA	RNA mensageiro
nEGFR	<i>Nuclear epidermal growth factor receptor</i> (receptor do fator de crescimento epidermal nuclear)
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> (sinal de localização nuclear)
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> (Fator de Transcrição nuclear Kappa B)
MD	<i>Molecular dynamic</i> (dinâmica molecular)
MEK-1	<i>Meiosis-specific serine/threonine-protein kinase</i> (cinase meiose-específica de serina e treonina)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato salino)
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> (antígeno nuclear de células proliferativas)

PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i> (fosfoinosítido-3-cinase)
PIP <sub>2</sub>	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato)
PIP <sub>3</sub>	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</i> (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato)
PKC	<i>Protein kinase c</i> (proteína cinase c)
PLC $\gamma$	<i>Phospholipase C<math>\gamma</math></i> (fosfolipase C $\gamma$ )
PNPase	<i>Polynucleotide Phosphorylase</i> (polinucleotídeo fosforilase)
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i> (acetato miristato de forbol)
PTB	<i>Phosphotyrosine binding domain</i> (domínio de ligação às fosfotirosinas)
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i> (difluoreto de polivinildieno)
Raf-1	<i>Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i> (proto-oncogene Raf 1, cinase serina/treonina)
Ras	<i>Rat sarcoma</i> (sarcoma de rato)
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i> (receptor tirosina cinase)
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SFK	<i>Src family kinases</i> (família de cinases Src)
SH2	<i>Src-homology 2 domain</i> (domínio de homologia a Src-2)
Shc	<i>Src-homology-2-containing</i> (contendo o domínio 2 de homologia a src)
Sos	<i>Son of sevenless homolog</i> (homólogo de son of sevenless)
Src	<i>Sarcoma</i> (sarcoma)
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> (transdutora de sinal e ativadora da transcrição 3)
TBS-T	<i>Tris-buffered saline and tween</i> (solução salina tamponada de tris com tween)
TGF- $\alpha$	<i>Transforming growth factor alpha</i> (fator de crescimento transformante alfa)
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>

UV

Ultravioleta

v-erbB

*Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene* (oncogene viral da leucemia eritroblástica aviária)

## II. LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> ESTRUTURA DO EGFR .....	<b>14</b>
<b>FIGURA 2.</b> SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO NA CAUDA CARBOXITERMINAL DO EGFR .....	<b>29</b>
<b>FIGURA 3.</b> EGF INDUZ A TRANSLOCAÇÃO DO EGFR PARA O NÚCLEO DE CÉLULAS SKHEP-1 .....	<b>44</b>
<b>FIGURA 4.</b> HB-EGF INDUZ A TRANSLOCAÇÃO DO EGFR PARA O NÚCLEO DE CÉLULAS SKHEP-1.. .....	<b>45</b>
<b>FIGURA 5.</b> B-CELULINA INDUZ A TRANSLOCAÇÃO DO EGFR PARA O NÚCLEO DE CÉLULAS SKHEP-1. ....	<b>46</b>
<b>FIGURA 6.</b> TGF- $\alpha$ INDUZ A TRANSLOCAÇÃO DO EGFR PARA O NÚCLEO DE CÉLULAS SKHEP-1.....	<b>47</b>
<b>FIGURA 7.</b> ANFIREGULINA NÃO INDUZ A TRANSLOCAÇÃO DO EGFR PARA O NÚCLEO DE CÉLULAS SKHEP-1.....	<b>49</b>
<b>FIGURA 8.</b> EPIREGULINA NÃO INDUZ A TRANSLOCAÇÃO DO EGFR PARA O NÚCLEO DE CÉLULAS SKHEP-1. ....	<b>50</b>
<b>FIGURA 9.</b> OS LIGANTES DE EGFR INDUZEM A FOSFORILAÇÃO DIFERENCIAL DOS RESÍDUOS PRESENTES NA CAUDA CARBOXITERMINAL DO RECEPTOR EGFR.. .....	<b>53</b>
<b>FIGURA 10.</b> OS LIGANTES DE EGFR SOZINHOS, NÃO INDUZEM A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS NAS CÉLULAS SKHEP-1.. .....	<b>55</b>
<b>FIGURA 11.</b> OS LIGANTES DE EGFR SÃO EFICIENTES EM INDUZIR A MIGRAÇÃO CELULAR APÓS “FERIDA” DE CÉLULAS SKHEP-1.....	<b>57</b>
<b>FIGURA 12.</b> OS LIGANTES DE EGFR INDUZEM A MIGRAÇÃO CELULAR APÓS “FERIDA” DE CÉLULAS SKHEP-1.....	<b>58</b>
<b>FIGURA 13.</b> CURVA DE CRESCIMENTO APÓS ESTÍMULO DAS CÉLULAS SKHEP-1 COM OS LIGANTES DE EGFR. ....	<b>60</b>

### III. LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> LISTAGEM DOS ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS NOS IMUNOBLOTS.. .....	38
<b>TABELA 2.</b> VALORES DE EC50 PARA OS LIGANTES DE EGFR.....	48
<b>TABELA 3.</b> QUANTIFICAÇÃO DAS BANDAS DETECTADAS NO IMMUNOBLOT DAS CÉLULAS ESTIMULADAS COM ANFIREGULINA E EPIREGULINA.....	54
<b>TABELA 4.</b> COMPARAÇÃO DOS EFEITOS NA MIGRAÇÃO CELULAR DE TODOS OS LIGANTES ENTRE SI. ....	59

#### IV. RESUMO

O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) ao entrar em contato com seus ligantes é ativado e se torna capaz de gerar diversos sinais como proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular. Estudos recentes demonstram que o EGFR ativado pode gerar efeitos intranucleares, consistindo assim um novo modo de sinalização. A superexpressão desse receptor no núcleo está relacionada com a resistência ao tratamento e com a presença de tumores mais agressivos. Visto que os dados recentes demonstram a importância do EGFR nuclear para a sinalização tumoral, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a translocação nuclear do EGFR estimulada pelos ligantes EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ -celulina, Anfiregulina e Epiregulina. Foram utilizadas células endoteliais de tumor hepático humano SKHep-1, as quais expressam altos níveis de EGFR. Observamos que ocorre translocação de EGFR após estímulo com EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$  e  $\beta$ -celulina e quanto maior a concentração do estímulo, maior a taxa de translocação nuclear do receptor. Os ligantes epiregulina e anfiregulina não geraram a translocação nuclear do EGFR. A ativação de tirosinas, serinas e treoninas na cauda carboxiterminal do EGFR foi avaliada por *western blot* após estímulo com 100 ng/mL de cada ligante e observou-se um perfil diferencial de fosforilação em vários resíduos específicos. Em geral, os ligantes que fosforilaram menos sítios foram epiregulina e anfiregulina. O teste de migração celular foi realizado para avaliar se os ligantes de EGFR eram eficientes na cicatrização de “ferida” em monocamada celular. Os ligantes EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina, TGF- $\alpha$  e epiregulina apresentaram maior taxa de fechamento da “ferida” quando comparados aos grupos sem soro e anfiregulina. Por fim, o ensaio de curva de crescimento e o ensaio de clonogenicidade indicaram que os ligantes não foram capazes de gerar o crescimento celular e a formação de colônias, quando utilizados isoladamente em meio sem soro. Estes dados indicam que o EGFR é translocado para o núcleo após estímulo por EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ -celulina e que estes mesmos ligantes geram maior perfil de fosforilação em resíduos de tirosina na cauda carboxiterminal do EGFR.

**Palavras-chave:** EGFR, ligantes, *western blot*, câncer, proliferação celular



## V. ABSTRACT

The epidermal growth factor receptor (EGFR) once in touch with their ligands is activated and becomes able to generate a range of signals such as proliferation, differentiation, migration and cell survival. Recent studies demonstrated that the activated EGFR can generate intranuclear effects, giving rise a new signaling mode. The receptor overexpression in the nucleus is related with tumor treatment resistance and it aggressiveness. Since recent data show the importance of nuclear EGFR for tumor signaling, this study aimed to evaluated the nuclear translocation of EGFR stimulated by the ligands EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ -cellulin, Amphiregulin and Epiregulin. For that, we used the hepatic human endothelial tumor cells - SKHep-1, which express high levels of EGFR. We observed that translocation to the nucleus happens after stimulation with EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$  and  $\beta$ -cellulin and the higher the concentration of stimulus, the greater the rate of nuclear translocation. The ligands Amphiregulin and Epiregulin did not generate nuclear translocation of EGFR. The activation of tyrosines, serines and threonines in the carboxiterminus of EGFR were evaluated by western blot after stimulus with 100 ng/mL of which ligand and we observed a different profile of phosphorylation of specific residues. In general, the binding sites that are less phosphorylated are the ones stimulated by the ligands Amphiregulin and Epiregulin. The cellular migration's experiment was performed to evaluate whether the EGFR ligand were efficient in the wound healing in the cell monolayer. The ligands EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ -cellulin and Epiregulin showed a higher wound closure rate when compared with the groups Amphiregulin and serum free. Finally the growth curve and the clonogenic assay indicated that the ligands were not able to generate cellular division and colony formation when used alone in the serum free medium. All together, these data indicated that EGFR is translocated to the nucleus after stimulation with EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$  and  $\beta$ -cellulin and the same ligands generate more phosphorylation of tyrosines in the carboxiterminus of EGFR.

**Key-words:** EGFR, ligands, *western blot*, cancer, cell proliferation

# 1.INTRODUÇÃO

### **1.1. O Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR)**

O fator de crescimento epidermal (EGF) foi primeiramente identificado em extratos das glândulas submaxilares de camundongos (Carpenter & Cohen, 1990; Cohen & Elliott, 1963), onde provocava erupção dentária e separação da pálpebra, através de crescimento da epiderme e queratinização (Cohen, 1962). Posteriormente foi identificado na urina humana, onde foi postulada sua função na proliferação de células epiteliais (Starkey, Cohen, & Orth, 1974) e finalmente foi isolado e algumas de suas funções biológicas determinadas (Cohen & Carpenter, 1975). Outros autores demonstraram que o EGF também possuía funções de diferenciação (Catterton et al., 1979) e indução da carcinogênese (Stoscheck & King, 1986).

A descoberta de que o EGF se ligava ao receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) aconteceu por meio dos estudos pioneiros de Joseph Schlessinger e colaboradores (J Schlessinger et al., 1983; Zidovetzki, Yardent, Schlessinger, & Jovin, 1981), que mostraram que estes complexos EGF-EGFR eram internalizados através da formação de vesículas revestidas no interior da célula e que, após a internalização, essas vesículas seguiam o caminho da degradação, fundindo-se com os lisossomos (Gorden, Carpentier, Cohen, & Orci, 1978). Foi descoberto que a ativação desses receptores não se dava apenas após a interação com o ligante, um passo a mais era necessário, a autofosforilação do receptor. O EGFR foi então classificado como um receptor do tipo tirosina cinase, por possuir a habilidade de transferir grupos fosfato da adenosina trifosfato (ATP) para resíduos de tirosina contidos em substratos celulares e resíduos do próprio receptor, onde caracteriza uma autofosforilação (Joseph Schlessinger, 2014; Ushiro & Cohen, 1980).

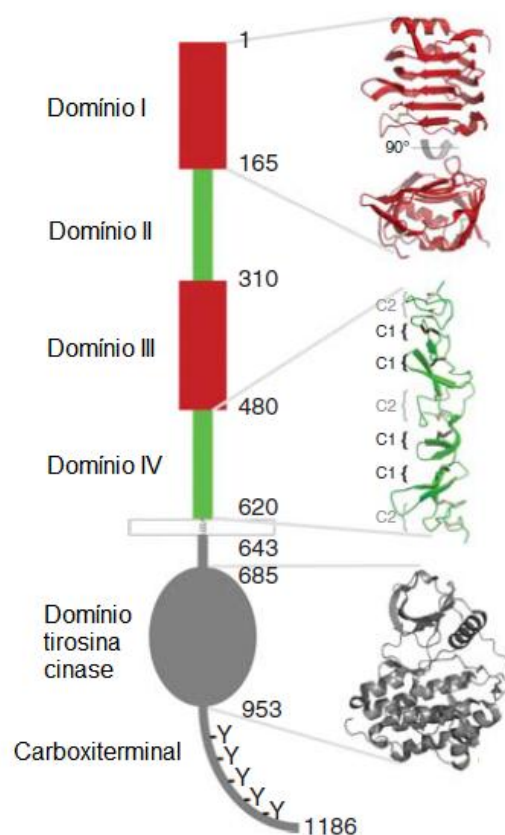
Moléculas na superfície celular comunicam informação do meio externo para o interior da célula. Este senso é crítico para organismos multicelulares, uma vez que as células precisam funcionar apropriadamente à sua localização e responder às necessidades do organismo. Dentre uma das maiores famílias que realizam essa função estão os receptores transmembrana com atividade tirosina cinase, sendo o EGFR um membro dessa família. O EGFR foi o

primeiro receptor a ser descrito como possuindo atividade tirosina cinase e o primeiro membro da superfamília a ser sequenciado (Schlessinger, 2014).

A caracterização molecular do EGFR aconteceu em 1984, após Julian Downward obter a sua sequência de aminoácidos e descobrir sua similaridade com o oncogene *v-erbB*, do vírus da leucemia eritroblástica aviária (Downward et al., 1984). Essa caracterização também demonstrou que existe uma forma truncada do EGFR, que perdeu grande parte da sua região extracelular de interação com o ligante e também sua cauda carboxiterminal onde se encontram as tirosinas passíveis de fosforilação. Mais tarde, outras proteínas relacionadas foram identificadas e classificadas como ErbBs (receptor do fator de crescimento epidermal). Assim, o EGFR, também chamado ErbB1 ou de HER1 (receptor humano de EGFR), pertence à família ErbB de receptores junto com o ErbB2 (Coussens et al., 1985), o ErbB3 (Kraus, Issing, Miki, Popescut, & Aaronson, 1989) e o ErbB4 (Plowman et al., 1993).

O produto proteico do gene *EGFR* é composto por 1186 resíduos de aminoácidos, constituindo uma glicoproteína transmembranar, que é clivada e direcionada para a membrana plasmática (Ullrich et al., 1984). A região extracelular aminoterminal contém 622 resíduos de aminoácidos. Além disso, há um domínio transmembranar em forma de alfa hélice única e um domínio intracelular de 542 resíduos de aminoácidos. O domínio intracelular apresenta uma região justamembrana regulatória de 50 resíduos de aminoácidos, um domínio com atividade de tirosina cinase de 250 resíduos e um segmento carboxiterminal de 250 resíduos, onde localizam os resíduos de tirosina, serina e treonina passíveis de fosforilação (Wells, 1999). Em sua totalidade, o receptor maduro apresenta um peso molecular de aproximadamente 170 kDa (Citri & Yarden, 2006). A região extracelular é constituída por quatro domínios distintos, de dois tipos diferentes, sendo os domínios I e III repetições de resíduos de leucina (também chamados L1 e L2) e os domínios II e IV ricos em resíduos de cisteína (também chamados CR1 e CR2) (Lax et al., 1988). Os domínios I e III contêm o sítio de interação com o ligante e o domínio II participa na formação de uma alça que é importante para a dimerização do receptor (Ogiso et al., 2002). A ligação do EGF à região extracelular do EGFR

induz a dimerização do receptor, que permite que os dois domínios tirosina cinase citoplasmáticos dos monômeros se encontrem perto o suficiente para realizar autofosforilação e ativar sua atividade tirosina cinase intrínseca. 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). O EGFR pode formar homodímeros ou heterodímeros com os outros receptores da família ErbB (Citri & Yarden, 2006). A estrutura de um monômero do EGFR está demonstrada na ilustração da Figura 1.



**Figura 1. Estrutura do EGFR.** Representação esquemática da organização em domínios do EGFR. (Adaptado de Lemmon, Schlessinger, & Ferguson, 2014)

Após a descoberta dos fatores de crescimento e seus receptores, um grande progresso foi feito no estudo do desenvolvimento embrionário normal, na cicatrização de feridas e em algumas condições patológicas, como o câncer. Estudos pioneiros feitos nas décadas de 60 e 70 mostraram que fatores de

crescimento possuíam diversas funções na oncogênese, como induzir a proliferação de células tumorais. Howard Temin em 1966 e 1967 demonstrou que células tumorais necessitavam de menor quantidade de insulina e fatores de crescimento no soro quando comparadas às células normais, sugerindo que células tumorais produzem e usam seus próprios fatores de crescimento (Temin, 1966, 1967).

O EGFR é expresso em uma variedade de tecidos normais nos mamíferos, como os de origem epitelial, mesenquimal e neuronal e seus progenitores celulares, onde determina processos fundamentais como morfogênese, crescimento, motilidade e sobrevivência. O EGFR é de extrema importância para o desenvolvimento epitelial e tem uma importante função na formação de diversos órgãos dos embriões (Gospodarowicz, 1981), como por exemplo, na formação do palato secundário (Hassell, 1975). A expressão de EGFR não está relacionada apenas com o estado de proliferação, mas também com a derivação da linhagem celular e com o estágio de diferenciação do tecido (Real et al., 1986). O *knockout* do gene *ERBB1* resulta em defeitos gastrointestinais, de pele e de pulmões, e camundongos EGFR<sup>-/-</sup> sobrevivem por até oito dias após o nascimento (Miettinen et al., 1995). Trabalho realizado por Sibilia e Wagner demonstrou que a maioria dos fetos dos mutantes desprovidos do receptor, morrem no meio da gestação e, os que sobrevivem até o nascimento, apresentam olhos sem pálpebra, pulmões imaturos e defeitos na epiderme (Sibilia & Wagner, 1995).

Em adição às funções fisiológicas, o EGFR também tem sido implicado em estados patológicos, como a progressão do câncer, onde está relacionado com a manutenção da sobrevivência de células tumorais e a promoção da angiogênese, sugerindo que o EGFR e os fatores de crescimento contribuem para a progressão tumoral por meio de diferentes mecanismos (Normanno et al., 2006). Muitos fenômenos são responsáveis pela ativação anormal do EGFR em tumores, incluindo superexpressão, amplificação, ativação constitutiva, presença de receptores mutantes e liberação autócrina de fatores de crescimento (Voldborg, Damstrup, & Poulsen, 1997).

A superexpressão do EGFR é capaz de induzir a transformação neoplásica na presença de níveis apropriados de ligantes (Di Fiore et al., 1987). Além disso, a sinalização via fatores de crescimento está relacionada à patogênese do câncer humano, e diferentes mecanismos podem contribuir para a amplificação do sinal dirigida pelos mesmos (Normanno et al., 2006). Por exemplo, a expressão de grandes números de receptores na superfície de células tumorais pode aumentar sua sensibilidade a baixas concentrações dos fatores de crescimento derivados do tumor ou do próprio organismo (Salomon, Brandt, Ciardiello, & Normanno, 1995).

## **1.2. Vias de sinalização mediadas por EGFR**

O primeiro passo para a ativação das vias dependentes de EGFR é a fosforilação de resíduos de tirosinas, serinas ou treoninas específicos na cauda carboxiterminal do receptor (CTD). Esses aminoácidos fosforilados, principalmente as fosfotirosinas, vão servir como sítios de ancoragem para proteínas com domínio de ligação a fosfotirosinas (PTB) e domínio de homologia a proteína Src 2 (SH2) presentes em proteínas sinalizadoras ou adaptadoras, formando complexos de sinalização (Prenzel, Fischer, Streit, Hart, & Ullrich, 2001). Alguns exemplos de proteínas que se ancoram ao EGFR são: proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento (Grb2), domínio 2 de homologia a src (Shc), sarcoma (Src), proto-oncogene de ABL 1 (Abl) e fosfolipase C gama (PLC $\gamma$ ) (Jorissen et al., 2003). A associação física destas proteínas adaptadoras com o EGFR aumenta a eficiência da fosforilação do substrato, e também serve de auxílio na formação dos complexos de sinalização (Prenzel et al., 2001).

A Grb2 e a Shc ativam a cascata das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Hallberg, Rayter, & Downward, 1994). Após ativação do EGFR, o domínio SH2 da proteína Grb2 liga-se diretamente às fosfotirosinas no EGFR (Batzer, Rotin, Urena, Skolnik, & Schlessinger, 1994) ou liga-se indiretamente através da Shc e há uma interação de Grb2/Sos (homólogo de son of sevenless) com Ras (sarcoma de rato), um fator de troca de nucleotídeo guanina, levando à ativação de Ras. Ras ativa, por sua vez, as cinases



serina/treonina Raf-1 e MEK1 (Hallberg et al., 1994), as quais finalmente ativam cinases reguladas por estímulos extracelulares (Erk1/2) que translocam para o núcleo onde regulam a transcrição de fatores como *ELK-1* e *c-FOS*, resultando na resposta de proliferação celular (G. Johnson & Vaillancourt, 1994).

Src, uma proteína tirosina cinase associada à membrana coopera na sinalização via EGFR, sendo que sua superexpressão está relacionada com a elevada proliferação e transformação de fibroblastos mediada por EGF em células epiteliais (Luttrell, Luttrell, & Parsons, 1988; Maa, Leu, McCarley, Schatzman, & Parsons, 1995). Além disso, a Src ativa a via das fosfatidilinositol-3-cinases (PI3K). A forma ativa da PI3K converte o lipídeo de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato ( $PIP_3$ ).  $PIP_3$  promove a fosforilação da proteína cinase B (Akt), que regula a função de muitas proteínas envolvidas em processos como sobrevivência, proliferação, adesão e migração celular (Cantley, 2002). A ativação dessa via é a principal responsável pelo efeito antiapoptótico da ativação do receptor EGFR (Prenzel et al., 2001). Outro exemplo de via ativada por sinalização de EGFR é a via da PLC $\gamma$ , a qual se liga diretamente ao EGFR fosforilado nos resíduos de tirosina 1173 e tirosina 992 (Chattopadhyay, Vecchi, Ji, Mernaugh, & Carpenter, 1999). Uma vez ativada, PLC $\gamma$  cataliza a hidrólise de  $PIP_2$  produzindo dois importantes segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ).  $IP_3$  gera a liberação de cálcio dos estoques intracelulares e DAG é cofator para a ativação da serina/treonina cinase PKC. EGFR pode ativar vias dependentes de cálcio, como Ral e NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B) que induz a expressão de genes envolvidos no crescimento celular (Sun & Carpenter, 1998). Em suma, a ativação do EGFR propaga o sinal externo mediado pelos ligantes da membrana citoplasmática para o núcleo, gerando um influxo de informação e acarretando, em última instância, em eventos nucleares importantes.

### **1.3. A localização nuclear do EGFR**

Em meados da década de 80 surgiram as primeiras evidências de que hormônios e fatores de crescimento, bem como seus receptores encontravam-se presentes no núcleo de suas células alvo (Burwen & Jones, 1987). O EGFR e seus ligantes são moléculas que vem sendo demonstradas como associadas ao núcleo. A localização do EGFR no núcleo foi primeiramente demonstrada por Marti e colaboradores em 1991 em hepatócitos de ratos em regeneração (Ulrich Marti et al., 1991) e mais tarde, o EGFR foi encontrado em núcleos de outros tipos celulares como útero, placenta (Cao, Lei, Bian, & Rao, 1995), tireoide (U Marti et al., 2001) e bexiga (Lipponen & Eskelinen, 1994). Além da localização do EGFR em núcleos de células saudáveis, detectou-se a presença do mesmo em diversos tipos de tumores, como os de mama, tireoide, bexiga (Lipponen & Eskelinen, 1994) e cavidade oral (Psyrrri et al., 2005). Numerosos estudos demonstraram que, no núcleo, o EGFR se encontra com sua estrutura completa e também na forma fosforilada (Lin et al., 2001; Hui-Wen Lo, Xia, et al., 2005). Além disso, os ligantes EGF (fator de crescimento epidermal) e o pro-TGF- $\alpha$  (pro-fator de crescimento transformante alfa) foram também encontrados no núcleo de hepatócitos em proliferação (Raper, Burwen, Barker, & Jones, 1987; Schausberger et al., 2003). Em adição à estimulação com o ligante, a translocação nuclear do EGFR pode ser induzida por irradiação, choque térmico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e cisplatina em alguns tipos celulares (Lin et al., 2001) e a translocação do receptor pode ser inibida por 1,25-dihidroxitamina D e o anticorpo anti-EGFR C225/Cetuximab (Dittmann et al., 2005).

Novas evidências sugerem a existência de um novo modo de sinalização via EGFR, onde o EGFR ativo transloca-se ao núcleo celular e subsequentemente regula a expressão gênica, além de outros processos celulares. Essa sinalização é distinta da sinalização citosólica tradicional e bem caracterizada do EGFR, que envolve a transdução de sinais através de múltiplas cascatas (Hui-Wen Lo, Hsu, et al., 2005; H-W Lo & Hung, 2006).

A atividade do nEGFR (EGFR nuclear) parece depender da transativação do seu domínio carboxiterminal e da sua interação física e funcional com outros fatores de transcrição que contenham sítios de ligação ao DNA, uma vez que o

EGFR não possui tais motivos. Em decorrência de sua habilidade de modular a expressão gênica, o EGFR nuclear está associado às principais características de tumores agressivos: potencial proliferativo aumentado, síntese de óxido nítrico, e aceleração da fase G1/S do ciclo celular (H-w Lo & Hung, 2006).

A alta expressão de EGFR nuclear está relacionada a um pior prognóstico e menor sobrevivência em pacientes com câncer de mama e câncer orofaríngeo de células escamosas, e também está relacionado com alta expressão de *ciclina D1*, *óxido nítrico sintase induzida (iNOS)* e *B-MYB* (oncogene viral da proteína homóloga aviária b-myb), genes estes superexpressos em cânceres humanos e associados com aumento da proliferação celular. Essa regulação ocorre por meio da interação do EGFR com a transdutora de sinal e ativadora da transcrição 3, STAT3, que por sua vez corregula a expressão de iNOS (Hui-Wen Lo, Hsu, et al., 2005), e também mediante a interação de EGFR com E2F1, que ativa a expressão de *B-MYB* (Hanada et al., 2006). *Ciclina D1* e *B-MYB* são reguladores positivos da progressão das fases G1/S do ciclo celular (Joaquin & Watson, 2003; Lin et al., 2001), e iNOS é uma enzima importante na produção de prostaglandinas, que atuam na quimioprevenção e quimioterapia, demonstrando uma natureza antitumoral (Cheng et al., 2014; Gupta & Dubois, 2001; W. Xu, Liu, Loizidou, Ahmed, & Charles, 2002). Adicionalmente, os promotores que regulam a expressão dos genes *Aurora-A cinase (AURKA)* (Hung et al., 2008), *Ciclooxigenase-2 (COX-2)* (HW Lo, Cao, Zhu, & Ali-Osman, 2010), *c-MYC* (Jaganathan et al., 2011), *timidilato sintase (TS)* (H.-P. Kim et al., 2009) e o promotor do gene que codifica uma proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) foram identificados como alvos do EGFR nuclear. Alvos esses, codificando proteínas envolvidas em tumorigênese, instabilidade cromossômica, e quimiorresistência.

Estudo pioneiro desenvolvido por Hung e colaboradores em 2012 demonstrou que o EGFR medeia radiorresistência por meio da inativação de uma nova proteína, a polinucleotídeo fosforilase (PNPase), que possui função de exoribonuclease 3' 5' no mRNA *c-MYC*. Tratamento da célula tumoral com irradiação gera translocação do EGFR para o núcleo, o qual se associa com proteína cinase dependente de DNA (DNAPK) direcionando a fosforilação da

proteína PNPase no resíduo de serina 776. Essa marca promove a inativação da função ribonucleásica da PNPase, o repressor pós-transcricional do mRNA *c-MYC*, resultando em sobrevivência celular e resistência à irradiação (Yu et al., 2012).

A localização do EGFR nuclear foi demonstrada em tecidos com alta capacidade proliferativa, como útero de camundongo em fase gestacional, embrião de rato, mucosa normal da boca humana e tecidos tumorais humanos (Lin et al., 2001). No mesmo trabalho foi demonstrado que o EGFR encontrava-se fisicamente associado à região promotora do gene que codifica a ciclina D1. Tal interação promove a ativação desse gene justificando portanto, a associação de EGFR nuclear com alta atividade proliferativa desses tecidos. EGFR nuclear também está positivamente correlacionado com a expressão de Ki-67, um indicador de proliferação (Hui-Wen Lo, Xia, et al., 2005).

Um estudo envolvendo pacientes com câncer de mama apontou significância patológica para a expressão de EGFR no núcleo. O receptor nuclear e não o citosólico está relacionado a um pior prognóstico para esses pacientes, sendo observada uma menor sobrevivência entre aqueles que apresentaram maior taxa de nEGFR (Hui-Wen Lo, Xia, et al., 2005). Adicionalmente, a expressão desse receptor no núcleo está relacionada com a malignidade e capacidade de metástase de tumores esofágicos (Hoshino et al., 2007). O nEGFR também está envolvido com a progressão do câncer de ovário (Xia et al., 2009) e carcinoma orofaríngeo, onde é diretamente relacionado com a maior recorrência desses tumores (Psyrris et al., 2008). Hoje, é um consenso que a localização nuclear do EGFR é um modo de proteção das células tumorais. Assim, a presença desse receptor no núcleo tem sido cada vez mais reconhecida como uma característica patológica tumoral (Hui-Wen Lo & Hung, 2006).

A região justamembrana do EGFR possui um sinal de localização nuclear (NLS) tripartido, putativo, composto por três grupos de aminoácidos básicos (RRRHIVRKRTLRR (resíduos 645–657)), os quais medeiam a localização nuclear do EGFR. Esse NLS é conservado entre a família dos ErbBs, e se

mostrou distinto dos NLS tradicionais, que se apresentam na forma mono ou bipartido (Hsu & Hung, 2007). A importina  $\beta$  também regula a translocação do EGFR para a membrana nuclear interna (INM). O bem caracterizado translocon Sec61 $\beta$  foi encontrado na membrana nuclear interna e associado ao EGFR. O *Knockdown* de Sec61 $\beta$  reduziu o conteúdo de EGFR no núcleo, assim como seu acúmulo na membrana nuclear interna (Y.-N. Wang et al., 2010).

Dentre as estratégias terapêuticas que visam o combate do câncer e que tem o EGFR como alvo estão os anticorpos monoclonais, os inibidores de tirosina cinase, as toxinas conjugadas a ligantes de EGFR e a terapia antissenso para receptores ErbBs. Os anticorpos monoclonais têm como alvo o domínio extracelular do EGFR, bloqueando assim a interação com o ligante (Goldstein, Prewett, Zuklys, Rockwell, & Mendelsohn, 1995). O Cetuximab é um exemplo de anticorpo monoclonal quimérico (humanizado) utilizado na clínica médica, que previne a ativação do receptor e sua dimerização. Já os inibidores de tirosina cinase ligam-se ao sítio catalítico de interação ao ATP, na região tirosina cinase do receptor, bloqueando sua ativação. Erlotinib, Gefitinib e Lapatinib são exemplos de fármacos com essa ação inibidora disponíveis no mercado (Hynes & Lane, 2005).

Diversos experimentos *in vitro* demonstram que linhagens tumorais se tornam resistentes após o tratamento com a terapia anti-EGFR. No caso da resistência ao inibidor Gefitinib, o EGFR nuclear parece funcionar como um ativador co-transcricional da proteína de resistência do câncer de mama (BCRP), que é capaz de expulsar as drogas anticâncer das células e então diminuir seus efeitos (W.-C. Huang et al., 2011). Vários estudos demonstraram que tratamento com Cetuximab pode aumentar a localização nuclear do EGFR, e que linhagens celulares com resistência intrínseca ao Cetuximab possuem altos níveis de nEGFR (C. Li, Iida, Dunn, Ghia, & Wheeler, 2009; D. Wheeler et al., 2008). Li e colaboradores demonstraram que as células resistentes ao Cetuximab possuíam alta atividade de cinases da família Src (SFK), e que inibição dessas SFKs com inibidores tirosina cinase, como o Dasatinib, restaurava a resposta ao Cetuximab por diminuir a taxa de nEGFR (D. L. Wheeler et al., 2009).

Existe uma correlação inversa entre o EGFR nuclear e a taxa de sobrevivência em pacientes com câncer de mama, sugerindo um fator prognóstico, para o nEGFR (Hui-Wen Lo, Xia, et al., 2005). Consequentemente, um entendimento mais minucioso da via de sinalização do EGFR irá facilitar o futuro sucesso de agentes anti-EGFR e o desenvolvimento de novas terapias que apresentem como alvo a via de EGFR. Ademais, o transporte nuclear do EGFR está sendo cada vez mais reconhecido como uma característica patológica em tumores. Na perspectiva da biologia do câncer, é possível que a localização nuclear do EGFR seja um mecanismo de manutenção da sinalização e da função de transativação desse receptor promovendo a progressão tumoral (S.-C. Wang & Hung, 2009).

#### **1.4. Os ligantes de EGFR**

Os fatores de crescimento que se ligam ao EGFR incluem o EGF, o fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), o fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina (HB-EGF), a Betacelulina ( $\beta$ -celulina), a anfiregulina, a epiregulina e o epígeno. Uma característica comum a todos os fatores de crescimento corresponde a uma sequência contendo seis resíduos de cisteína conservados e espaçados entre 35 a 40 resíduos de aminoácidos para formar três pontes dissulfeto intramoleculares, CX<sub>7</sub>CX<sub>3-5</sub>CX<sub>10-12</sub>CXCX<sub>5</sub>GXRC (C, cisteína; G, glicina; R, arginina; X, outros aminoácidos) (J Massagué & Pandiella, 1993). Essa sequência consenso é conhecida como “o motivo EGF” e é crucial para a função de ligação dos membros da família dos receptores do tipo tirosina cinase. Os precursores de todos os ligantes correspondem a proteínas transmembrana do tipo I inseridas na membrana plasmática, as quais são clivadas por enzimas desintegrinas e metaloproteases de superfície celular (ADAM), de modo a liberar os fatores de crescimento maduros (Schlondorff & Blobel, 1999).

EGF é um peptídeo de 53 resíduos de aminoácidos, inicialmente sintetizado como um precursor glicosilado de 1217 resíduos (~170kDa) (Carpenter & Cohen, 1990). O pré-pró-EGF possui um sinal hidrofóbico e um domínio

transmembrana, que o torna associado à membrana, onde ele se mostra biologicamente ativo para ligar e estimular o receptor presente nas células adjacentes (J Massagué & Pandiella, 1993). O EGF possui algumas características bioquímicas não usuais, sendo estável ao calor, resistente a degradação enzimática pela tripsina, quimiotripsina e pepsina (Ulrich Marti, Burwen, & Jones, 1989). O EGF é expresso em vários tecidos adultos, especialmente os epiteliais e o trato gastrointestinal. Sítios predominantes de síntese deste peptídeo são as glândulas submandibulares e salivares, glândulas de Brunner, intestino e rim (Kajikawa et al., 1991).

TGF- $\alpha$  foi o segundo ligante de EGFR a ser descoberto, e consiste em um peptídeo de 50 resíduos aminoácidos, inicialmente isolado do sobrenadante da cultura de fibroblastos transformados de sarcoma (De Larco & Todaro, 1978), e possui 33% de homologia com o EGF humano (Hans, Michael W, Leroy E, & George J, 1984). A estrutura secundária do TGF- $\alpha$  é idêntica a do EGF e conserva as três pontes dissulfeto em sua estrutura. O TGF- $\alpha$  liga e transmite sinais exclusivamente através do EGFR. O TGF- $\alpha$  é sintetizado como uma proteína transmembrana glicosilada de 160 resíduos aminoácidos (Joan Massagué, 1990). O peptídeo de 5,6 kDa é encontrado na região aminoterminal do precursor e é clivado por uma enzima do tipo elastase. TGF- $\alpha$  é expresso em alguns processos fisiológicos, como durante a embriogênese, e em alguns tecidos, especialmente os regenerativos e células epiteliais (Coffey Jr et al., 1987). Camundongo transgênico com superexpressão para TGF- $\alpha$  apresenta hiperplasia do fígado, pâncreas, estômago, intestino, glândulas e propensão para o aparecimento de adenocarcinomas mamários (Sandgren, Luetkeke, Palmiter, Brinster, & Lee, 1990). Observa-se uma desregulação na secreção de TGF- $\alpha$  em vários cânceres epiteliais (Coffey, Romano, Polk, & Dempsey, 1992; Fiske, Threadgill, & Coffey, 2009) e em alguns tipos de linhagens de carcinomas, em tumores humanos primários, em fibroblastos e células epiteliais transformadas (Singh & Coffey, 2014).

A anfiregulina foi inicialmente purificada do sobrenadante da cultura celular de células MCF-7 tratadas com acetato miristato de forbol (PMA) (SHOYAB, MCDONALD, BRADLEY, & TODARO, 1988) e consiste em uma cadeia única

hidrofílica, inicialmente sintetizada como um precursor transmembranar glicosilado de 252 resíduos de aminoácidos. Foi denominada como anfiregulina por apresentar propriedades de inibição do crescimento em células A431 e outras linhagens tumorais, assim como propriedades de proliferação, embora suas ações inibitórias não fossem subsequentes validadas (SHOYAB et al., 1988). A anfiregulina se liga e ativa o EGFR, pelo qual ela tem uma baixa afinidade quando comparada ao EGF e ao TGF- $\alpha$  (G. R. Johnson, Kannans, Shoyabn, & Stromberg, 1993; Shoyab, Plowman, Mcdonald, Bradley, & Todaro, 1988). Este fator foi purificado em duas isoformas, uma contendo 78 resíduos e a outra, 84 resíduos de aminoácidos, as quais possuem 38% e 32% de homologia com o EGF, respectivamente. A anfiregulina é expressa em células epiteliais normais e malignas *in vitro* e no cólon normal *in vivo*, sendo postulado seu envolvimento na patogênese de alguns carcinomas de cólon (Ciardiello, Kim, & Saeki, 1991; G. R. Johnson et al., 1992). A expressão de anfiregulina não é detectada no fígado normal, mas é prontamente induzida durante dano agudo nesse tecido, sendo o ligante um potente fator pró-regenerativo e de sobrevivência. Alta taxa de expressão de anfiregulina também é detectada em dano crônico do fígado (cirrose), que é considerado uma condição pré-neoplásica (Berasain, Castillo, Perugorría, Prieto, & Avila, 2007).

HB-EGF é um peptídeo de 22 kDa que foi originalmente isolado de macrófagos e monócitos humanos, sendo sua função mitogênica demonstrada em fibroblastos e células musculares lisas, mas não observada em células endoteliais (Higashiyama, Abraham, Miller, & Klagsbrun, 1991). HB-EGF é inicialmente sintetizado como uma glicoproteína transmembranar de 208 resíduos de aminoácidos, que contém um peptídeo sinal hidrofóbico e um domínio transmembranar (Higashiyamas, Lauq, Besners, Abraham, & Klagsbrun, 1992). Interessantemente, o precursor do HB-EGF pode funcionar como receptor da toxina bacteriana da difteria por sua habilidade de se ligar ao fragmento-B da molécula da toxina (Naglich, Metherall, Russell, & Eidels, 1992). HB-EGF é expresso em células hematopoiéticas, células endoteliais e epiteliais (Higashiyama, Abraham, & Miller, 1991; Raab & Klagsbrun, 1997). Este ligante está relacionado aos processos de cicatrização de feridas,



implantação do blastocisto, aterosclerose e crescimento de tumores (MARIKOVSKY et al., 1993; Miyagawa et al., 1995; Peoples et al., 1995; Raab et al., 1996). A expressão de HB-EGF também foi detectada em uma variedade de linhagens celulares derivadas de tumores de próstata, mama, cólon, melanoma e pâncreas. Muitos estudos apontam a elevada expressão do gene que codifica HB-EGF em tumores comparada aos tecidos normais (Raab & Klagsbrun, 1997). A forma solúvel é um mitógeno parácrino e autócrino potente para células de câncer de tireoide (Ota et al., 2013), fibroblastos (Besner, Higashiyama, & Klagsbrun, 1990), células musculares lisas (Higashiyama & View, 1993) e queratinócitos (Hashimotos et al., 1994). Além da ativação do receptor pela molécula de HB-EGF solúvel, tem sido sugerido que a forma associada à membrana, não clivada, pode ativar o receptor EGFR presente nas células adjacentes e estimular a proliferação celular, na chamada estimulação justácrina (Higashiyama et al., 1995; Takemura, Kondo, Homma, Sakai, & Harris, 1997)

$\beta$ -celulina foi originalmente identificada e purificada através do meio de cultura condicionado de insulinomas pancreáticos de células  $\beta$  de camundongos (Shing et al., 1993). Posteriormente, o cDNA da  $\beta$ -celulina foi clonado de biblioteca de cDNA da célula tumoral humana, MCF-7 (Sasada et al., 1993). Este ligante está expresso em uma variedade de células de origem mesenquimal e epitelial, e em muitos tecidos adultos, sendo observada altas expressões no pâncreas, fígado, rim e intestino (Dunbar & Goddard, 2000; Sasada et al., 1993) e reduzidas no coração, pulmões, cólon, testículo e ovário (Masaharu et al., 1996). Além de altamente expresso nas linhagens derivadas de tumores, foi detectada a expressão *in situ* da  $\beta$ -celulina em tumores pancreáticos (M et al., 2000) (Dahlhoff, Wolf, & Schneider, 2014). A forma madura humana deste fator consiste de 80 resíduos de aminoácidos e apresenta elevado peso molecular (32 kDa), decorrente da extensiva glicosilação da proteína. Em adição aos seis resíduos de cisteínas consensos do motivo EGF, a molécula de  $\beta$ -celulina madura apresenta dois resíduos de cisteínas adicionais na terminação amino, as quais formam uma quarta ponte dissulfeto (Watanabe et al., 1994). Assim como a anfiregulina,  $\beta$ -celulina se liga

ao EGFR com aproximadamente um décimo da afinidade apresentada pela molécula de EGF (Salomon et al., 1995).

A epiregulina foi primeiramente obtida do meio de cultura condicionado de fibroblastos de rato derivados da linhagem tumoral NIH3T3/ clone T7 (Toda et al., 1995). A epiregulina é sintetizada como um precursor de 169 resíduos de aminoácidos, que é então clivado gerando um peptídeo de 46 resíduos e apresenta 24-50% de identidade com outros membros da família de ligantes de EGFR. Este ligante possui baixa afinidade pelo EGFR quando comparado com o EGF e o TGF- $\alpha$ . A sua expressão em adultos é restrita, com baixos níveis na epiderme, cólon, pulmões e macrófagos, e esta expressão é bem menor quando comparada a outros membros da família do EGF (TOYODA, KOMURASAKI, UCHIDA, & MORIMOTO, 1997). Camundongos com mutação nula para epiregulina são viáveis e não apresentam fenótipo anormal (Lee et al., 2004). O fator epiregulina é superexpresso em diversas linhagens tumorais (Baba, Shirasawa, & Iwamoto, 2000; SHIGEISHI et al., 2008; Zhu et al., 2000), sendo um dos genes mais superexpressos na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231. A epiregulina contribui para os processos de inflamação, cicatrização de feridas, reparo tecidual, maturação de oócitos, angiogênese, remodelamento vascular e estimulação da proliferação celular (Riese & Cullum, 2014).

Os ligantes de EGFR majoritariamente são divididos em duas classes: os de alta afinidade (EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF e  $\beta$ -celulina) e os de baixa afinidade (anfiregulina, epiregulina e epígeno). Os de alta afinidade se ligam com uma constante de dissociação (Kd) entre 1 e 100nM, e os de baixa afinidade com uma constante de dissociação (Kd) maior que 100nM (Jones, Akita, & Sliwkowski, 1999). Artigo recente publicado desvendou por meio de métodos computacionais de dinâmica molecular (MD), a afinidade de ligação dos ligantes de EGFR e mostrou que a mesma se dava através da seguinte hierarquia: EGF>HB-EGF>TGF- $\alpha$ > $\beta$ -celulina>Epiregulina>Epígeno>Anfiregulina (Sanders, Wampole, Thakur, & Wickstrom, 2013).

A informação do papel dos ligantes de EGFR no desenvolvimento normal de diferentes órgãos e tecidos foi obtida por meio de estudos de modelos animais com mutações nulas. Por exemplo, os camundongos que não expressam EGF ou TGF- $\alpha$  apresentam desenvolvimento anômalo da próstata. Camundongo *knockout* para o TGF- $\alpha$  possui proliferação aumentada das glândulas prostáticas quando comparadas ao controle (Abbott et al., 2003). Diferentes membros da família dos fatores de crescimento, como o EGF, HB-EGF e TGF- $\alpha$ , são expressos em todo sistema nervoso central e periférico e regulam atividades como proliferação, migração e diferenciação (CJ & XF, 2004). Camundongos com mutações triplas nulas para anfiregulina, EGF e TGF- $\alpha$  apresentam retardo no crescimento presumivelmente devido a alterações no trato gastrointestinal como decréscimo na produção de mucina, formação de vilosidades curtas e redução da síntese de DNA nas células crípticas da mucosa intestinal (Troyer et al., 2001).

Sabe-se que a expressão em células tumorais de alguns ligantes específicos tem um significado patológico. A expressão, mais notavelmente de TGF- $\alpha$ , HB-EGF e anfiregulina está associada a um pior prognóstico e uma maior resistência à quimioterapia (Celikel, Eren, Gulluoglu, Bekiroglu, & Turhal, 2007; Eckstein et al., 2008; F Wang et al., 2007). Em amostras de câncer de mama, a expressão de EGF está associada a um prognóstico mais favorável, enquanto a expressão de TGF- $\alpha$  está associada a tipos de tumores mais agressivos (Révillion, Lhotellier, Hornez, Bonnetterre, & Peyrat, 2008).

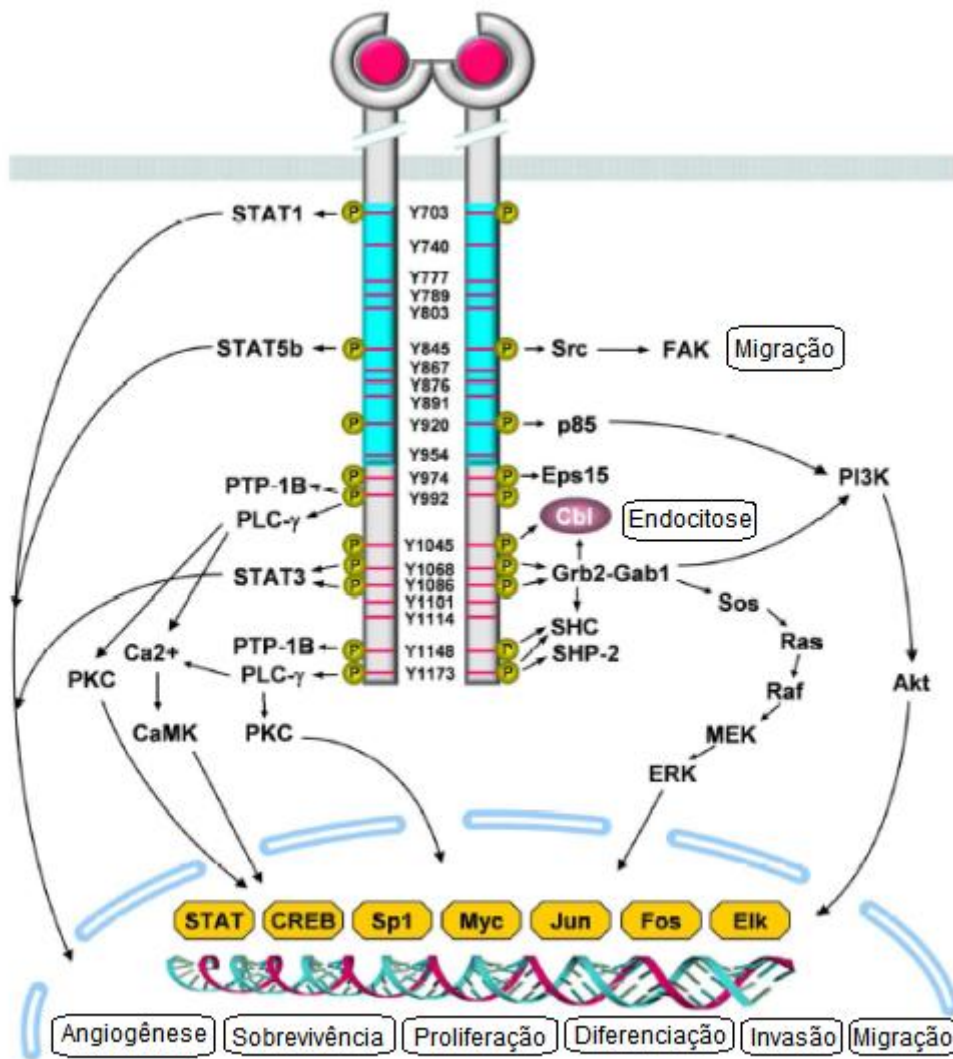
Em uma variedade de modelos de cultura celular, diferentes ligantes que se complexam com o mesmo receptor promovem resultados biológicos divergentes. Resultados emergentes indicam que isso é verdadeiro até para ligantes presentes em concentrações saturantes. Assim, essas distinções na sinalização são independentes da afinidade de ligação ou da potência do ligante e parecem refletir diferenças na atividade intrínseca do ligante ou sua eficácia em promover a sinalização *downstream* (Wilson, Gilmore, Foley, Lemmon, & Riese, 2009).

Os diferentes ligantes de EGFR induzem a internalização diferencial do receptor, levando a um efeito diverso na distribuição endocítica do mesmo. É bem estabelecido que, enquanto a ligação de EGF leva à degradação lisossomal, TGF- $\alpha$  causa reciclagem de EGFR (Roepstorff, Grøvdal, Grandal, Lerdrup, & van Deurs, 2008), o que qualifica esse último como um fator mitógeno mais potente (Waterman, Sabanai, Geiger, & Yarden, 1998). Essa diferenciação é explicada pelos autores em função da maior estabilidade de ligação do EGF ao EGFR, o que permite maior ubiquitinação do receptor, e conseqüentemente, maior taxa de degradação via proteassomo.

O EGFR e seus ligantes contribuem com processos relevantes para o desenvolvimento e progressão tumoral, sendo bem documentado seu papel na patogênese do câncer. Alguns dos ligantes de EGFR são encontrados em concentrações aumentadas nos cânceres humanos, onde eles possuem funções autócrinas e parácrinas na sinalização da progressão tumoral. Algumas linhas de evidência sugerem que os ligantes de EGFR podem estar implicados na não responsividade aos tratamentos cujo alvo é o receptor. (Révillion et al., 2008).

### **1.5. Ativação do EGFR e marcas de fosforilação na CTD**

A ativação do EGFR pelos diferentes ligantes leva a autofosforilação dos resíduos de tirosinas, serinas e treoninas presentes na cauda carboxiterminal do receptor. Esses resíduos estão compreendidos entre as posições 703 e 1173 totalizando aproximadamente 20 marcas de fosforilação em tirosinas localizadas nessa região. Além disso, soma-se os resíduos de serina na posição 1046/1047, e treonina 669. (Countaway, McQuilkin, Girones, & Davis, 1990) (Bao et al., 2000). A figura a seguir adaptada de (Y. Huang & Chang, 2011) resume os principais resíduos de tirosinas na cauda carboxiterminal do EGFR.



**Figura 2. Sítios de fosforilação na cauda carboxiterminal do EGFR.** Representação dos principais tirosinas passíveis de autofosforilação pelo EGFR

Já é amplamente sabido que a autofosforilação em tirosinas nos RTKs é necessária para o recrutamento e ativação de moléculas sinalizadoras, e que estas levam a respostas celulares diversas como proliferação, diferenciação e angiogênese (Normanno et al., 2006). Muito embora vários estudos caracterizem a associação dos diferentes ligantes do EGFR às marcas específicas de fosforilação na cauda carboxiterminal do receptor, poucos correlacionam as diferenças de fosforilação com os distintos efeitos biológicos que estas geram.

Células de tumor de mama MCF10A quando estimuladas com EGF apresentaram maior índice de fosforilação no resíduo de tirosina 1045 quando comparadas às células estimuladas com anfiregulina. Este perfil parece estar associado com o acoplamento de EGFR com c-cbl, uma proteína ubiquitina ligase, e a ativação da via da degradação do EGFR após endocitose via ubiquitinação (Eden, Huang, Sorkin, & Futter, 2012; Roepstorff et al., 2009). Além disso, tanto EGF quanto anfiregulina estimulam a fosforilação de EGFR na tirosina 992, que possibilita a ligação da PLC $\gamma$  ao EGFR (Wilson et al., 2012).

Estudo publicado em 2010 demonstrou que mutação deletéria na treonina 654, que impede a sua fosforilação e se encontra dentro do sinal de localização nuclear do EGFR, é essencial para a translocação nuclear do receptor após estímulo com irradiação. A deleção desta treonina bloqueia o transporte nuclear do EGFR após indução por irradiação, e sua substituição por glutamato, que mimetiza uma fosforilação permanente, aumenta o transporte nuclear, mesmo sem o estímulo de irradiação. O bloqueio da translocação nuclear do EGFR no grupo com deleção no resíduo de treonina 654 afeta o reparo de DNA após irradiação, apresentando este grupo dano no DNA superior ao controle (Dittmann et al., 2010). Assim, é preciso identificar os resíduos alvo que se encontram fosforilados após estímulo com os ligantes de EGFR para relacionar os mesmos com a participação na sua translocação. Pode-se então, criar novos alvos nos resíduos fosforilados para o bloqueio da translocação e então superar a resistência de tumores ao tratamento.

## **1.6. Justificativa**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é um problema de saúde pública mundial e é uma das principais causas de morte do mundo. De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês International Agency for Research on Cancer), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes

por câncer, em todo o mundo, em 2012. A estimativa da OMS aponta que 13,2 milhões de pessoas irão morrer dessa doença em 2030 (OMS, 2012). A estimativa de 2014 para o Brasil, dada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), indicou mais de 580 mil novos casos de câncer em nosso país (INCA, 2014). Ainda de acordo com a OMS, muitos tipos de câncer têm alta chance de cura se diagnosticados em fase inicial e tratados adequadamente.

O tratamento para diversos tumores tem como alvo o receptor celular EGFR. Entretanto, muitas vezes o sucesso destas terapias não é alcançado em função de diversos mecanismos de resistência (Takeuchi & Yano, 2014). Assim, o uso de terapias múltiplas atuando por mecanismos distintos e tendo o EGFR como alvo pode potencializar as respostas. A identificação de agentes adicionais para o tratamento do câncer, como o estudo dos ligantes de EGFR, pode ser uma importante ferramenta para estudo da biologia do câncer.

A significância clínica da superexpressão do EGFR em uma multitude de cânceres está sendo amplamente investigada, e como já mencionado, muitos estudos relataram que alta expressão de EGFR em tumores é um fator prognóstico negativo (Hui-Wen Lo & Hung, 2006). Até hoje, os níveis de expressão dos ligantes de EGFR não foram investigados na mesma extensão. Considerando os efeitos dos diferentes ligantes sobre a sinalização induzida pelo EGFR é de grande importância investigar as várias combinações de ligantes sobre a ativação do EGFR. Este estudo consiste em um passo inicial para entender a relação entre a presença do EGFR no núcleo após o estímulo com os ligantes de EGFR.

## **2.OBJETIVOS**



## **2.1. Objetivo geral**

Determinar o efeito dos diferentes ligantes do EGFR para a translocação nuclear do EGFR.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Estudar a translocação nuclear do EGFR induzida pelos ligantes EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ -celulina, Anfiregulina, Epiregulina.
- Avaliar o perfil de fosforilação dos resíduos do domínio carboxiterminal de EGFR em resposta ao estímulo com os ligantes
- Analisar o efeito dos ligantes do EGFR na taxa de migração e proliferação de células tumorais, além da capacidade de formação de colônias.

# **3.MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Cultura Celular**

A linhagem celular de origem endotelial derivada de adenocarcinoma hepático humano, denominada SKHep-1, foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC). Essas células foram cultivadas em meio basal de Dulbecco (DMEM; Sigma) suplementado com 5mM de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco - Life Technologies), 100 unidades/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Gibco - Life Technologies) (DMEM completo), a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e em atmosfera úmida.

### **3.2. Estímulo com os ligantes de EGFR**

Células SKHep-1 foram plaqueadas em placas de 60x15mm na densidade de 1x10<sup>6</sup> células/mL em DMEM completo. Após 48 horas, observava-se 80% de confluência celular e o meio DMEM completo era removido. Em seguida, as células foram mantidas em meio DMEM sem soro por 12-16 horas. Decorrido tal período, as células foram incubadas com os ligantes de EGFR por 10 minutos a 37°C, em 5% CO<sub>2</sub>. A reação foi interrompida com a rápida remoção do meio, lavagem com solução salina tamponada com fosfato (11,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,6 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 137 mM NaCl, pH7,4 – PBS) gelada e adição de tampão para a extração de proteínas.

Os ligantes de EGFR utilizados foram: EGF recombinante humano (Sigma), HB-EGF recombinante humano (R&D Systems), β-celulina recombinante humano (R&D Systems), TGF-α recombinante humano (R&D Systems), Anfiregulina recombinante humano (R&D Systems) e Epiregulina recombinante humano (R&D Systems), nas concentrações de 1 ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL, 50ng/mL e 100ng/mL.

### **3.3. Extração de proteínas totais**

A extração de proteínas totais das células foi realizada utilizando o tampão NETN, composto por: 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 0,5% de Nonidet P-40 e 1% dos coquetéis de inibidores de proteases e fosfatase (Sigma). O homogenato foi sonificado por 1 minuto, incubado no gelo

por 10 minutos e centrifugado a 16000xg por 20 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C.

### **3.4. Fracionamento celular**

Para o fracionamento celular, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (11,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,6 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 137 mM NaCl, pH 7,4 – PBS), e adicionado o tampão de lise (20 mM HEPES, pH 7,0, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% Nonidet P-40 e 1% de inibidores de proteases). As amostras foram homogeneizadas por vórtex por 1 minuto e incubadas no gelo por 10 minutos, e por fim, realizada a centrifugação a 1.500xg por 5 minutos a 4°C para sedimentação do núcleo. O sobrenadante foi centrifugado a 16000xg por 20 minutos a 4°C e coletado, consistindo na fração não-nuclear. O pellet nuclear foi lavado três vezes com tampão de lise para remoção dos contaminantes da fração não nuclear. Em seguida, o pellet foi ressuscitado em tampão NETN (150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 0,5% de Nonidet P-40) e sonificado por 1 minuto. O lisado nuclear foi coletado após centrifugação a 16000xg, 20 minutos, 4°C.

### **3.5. Quantificação de proteínas**

Os extratos proteicos totais e os decorrentes do fracionamento celular foram dosados em placas de 96 poços pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o reagente de Bradford da Sigma-Aldrich, e seguindo as recomendações do fabricante. A curva padrão foi preparada utilizando albumina de soro bovina (BSA) (Sigma-Aldrich), e a leitura das absorvâncias a 595 nm avaliadas no leitor de placas ELx 800 Universal Microplate reader (Bio-TEK INSTRUMENTS, INC.).

### **3.6. Western blot**

Os extratos proteicos foram resolvidos em gel desnaturante de poliacrilamida. O gel foi preparado em placas de vidro com espaçadores de 1,5

mm. O gel de separação era constituído de 8 % (v/v) de uma solução de: acrilamida/bisacrilamida 40% (p/v); Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 10% (p/v); 10% de persulfato de amônia (PSA) (p/v) e 0,05% (v/v) de TEMED. O gel de concentração era constituído de 3,9% (v/v) de uma solução de: acrilamida/bisacrilamida 40% (p/v); Tris-HCl 1,0 M pH 6,8; SDS 10% (p/v); 10% de persulfato de amônia (PSA) (p/v) e TEMED 0,05% (v/v).

Aproximadamente 30 a 40 µg de proteínas foram utilizadas em cada corrida eletroforética. As amostras foram adicionadas ao tampão de amostra desnaturante para SDS-PAGE 5x concentrado (0,313M de Tris-HCl pH 6,8; 10% de SDS; 0,05% de Azul de Bromofenol; 10% de DTT; 50% de glicerol) e, em seguida aplicadas nas canaletas do gel. A eletroforese foi desenvolvida verticalmente com o tampão de eletroforese SDS-PAGE (0,3% Tris-HCl; 1,2% de glicina e 0,1% de SDS) a 120 volts durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos, até que o tampão da amostra atingisse o final do gel. Ao término da corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (BioRad) pelo sistema de transferência semi-seco (BioRad), por 90 minutos. A membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (20 mM Tris e 200 mM NaCl, pH7,4 – TBS) contendo 0,5% Tween-20 (Sigma) (TBS-T) por 1 hora e depois incubadas no período da noite a 4°C com o anticorpo primário diluído em TBS-T com 5% de leite desnatado. Os anticorpos utilizados estão listados na tabela a seguir:

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Marca</b>
anti-EGFR policlonal	1:250	Santa Cruz Biotechnology
anti- $\alpha$ -tubulina monoclonal	1:5.000	Sigma
anti-lamina B1 policlonal	1:50.000	Abcam
Anti-Erk 1/2 total	1:1.000	Cell Signaling
Anti-fosfo-Erk 1/2 (T202/Y204)	1:500	Cell Signaling
Anti-Akt total	1:1.000	Cell Signaling
Anti-fosfo-Akt (T308)	1:500	Cell Signaling
anti-EGFR fosforilado (Thr 669) monoclonal	1:100	Cell Signaling
anti-EGFR fosforilado (Tyr 845) monoclonal	1:200	Cell Signaling
anti-EGFR fosforilado (Tyr 992) monoclonal	1:100	Cell Signaling
anti-EGFR fosforilado (Tyr 998) monoclonal	1:200	Cell Signaling
anti-EGFR fosforilado (Tyr 1045) monoclonal	1:200	Cell Signaling
anti-EGFR fosforilado (Ser 1046/1047) monoclonal	1:100	Cell Signaling
anti-EGFR fosforilado (Tyr 1086) monoclonal	1:200	Cell Signaling
anti-EGFR fosforilado (Tyr 1148) monoclonal	1:200	Cell Signaling
anti-EGFR fosforilado (Tyr 1173) monoclonal	1:200	Cell Signaling

**Tabela 1. Listagem dos anticorpos primários utilizados nos imunoblots.** Nesta lista se inclui o anticorpo que reconhece EGFR total, tubulina e lâmina B1 e os anticorpos anti-tirosina fosforilada em EGFR.

As membranas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com TBS-T, e então, incubadas por 1 hora com anticorpo secundário, a temperatura ambiente. Os anticorpos secundários anti-coelho (Life Technologies) ou anti-camundongo (Millipore) usados são conjugados a peroxidase (1:5000). As bandas foram

reveladas em filme (Carestream® Kodak® BioMax® light film) por reação de quimioluminescência com o reagente ECL Plus (Thermo Scientific). Os filmes foram escaneados e as análises quantitativas realizadas utilizando o software Image J.

### 3.7. Cálculo dos valores de EC<sub>50</sub>

A partir dos dados coletados através da análise dos *westerns blots* descritos na seção 3.6, foi possível calcular os valores de EC<sub>50</sub> utilizando o software GraphPad para os ligantes EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$  e  $\beta$ -celulina. Resumidamente, os valores de EC<sub>50</sub> foram obtidos automaticamente a partir da análise dos pontos dos dados experimentais. O modelo utilizado assume que a curva de dose-resposta possui uma inclinação padrão igual à inclinação de Hill de 1. Esta é a inclinação esperada quando o ligante se liga ao receptor seguindo a lei de ação das massas. Foi utilizado a seguinte fórmula:

$$Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X))})$$

onde X corresponde a concentração do ligante na escala logarítma, Y corresponde a resposta gerada e os valores Superior e Inferior correspondem à maior e à menor concentração de ligante, respectivamente.

### 3.8. Ensaio de migração (*Scratch assay/ wound healing*)

Células SKHep-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL em DMEM completo. Aguardava-se a confluência total dos poços para se realizar o ensaio, que se baseia na criação de uma interrupção da continuidade de uma monocamada celular, por meio de uma falha ou ferida, e o acompanhamento do fechamento dessa abertura por observação e fotografia em microscópio de luz. Após a constatação da confluência total, a ferida era realizada no centro do poço da placa de 6 poços com o auxílio da ponteira de 1000  $\mu$ L, e os poços eram lavados com meio para a remoção dos debris celulares. Em cada poço foram adicionados 2 mL de DMEM sem soro acrescido de 100 ng/mL dos ligante de EGFR. O estímulo com o ligante foi feito

somente uma vez, no tempo zero e o mesmo foi mantido por todo tempo do experimento. Os grupos controles consistiram em células mantidas apenas em meio DMEM sem soro e em meio completo. O fechamento da ferida foi acompanhado nos tempos 0, 12, 24 e 36 horas por meio de fotodocumentação. Para determinar a taxa de migração celular, a área inicial da ferida foi arbitrariamente marcada como 100% da área livre de células. O decréscimo dessa área livre caracterizou o índice de migração celular. A taxa de migração foi analisada pelo software Image J. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

### **3.9. Ensaio Clonogênico**

O ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônia detecta a capacidade de uma única célula gerar células-filhas após tratamentos que podem ocasionar a morte reprodutiva (Franken, Rodermond, Stap, Haveman, & Bree, 2006). Foram plaqueadas 900 células SKHep-1 em placas de 6 poços, em DMEM completo, e estas foram mantidas na estufa de CO<sub>2</sub> por 10 dias. No segundo dia, o DMEM completo era retirado e as células mantidas em DMEM sem soro, seguido do estímulo das células com todos os ligantes de EGFR na concentração de 100 ng/mL. Também foram mantidos grupos controle com DMEM completo e grupo controle com apenas DMEM sem soro. O estímulo foi realizado diariamente, sendo que o ligante foi mantido por todo o experimento e a troca do meio foi realizada a cada 3 dias. Após os 10 dias, o meio foi removido e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 5 minutos, lavadas com PBS e adicionada a solução corante (6% de glutaraldeído e 0,5 % de cristal violeta) por 30 minutos. A solução corante foi removida e o excesso do reagente eliminado com a lavagem das placas com água. As placas foram fotografadas para detecção da presença de colônias.

### **3.10 Ensaio de crescimento**

Células SKHep-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de  $3 \times 10^5$  células/mL em DMEM completo. Após 24 horas, as células foram incubadas com os ligantes de EGFR na concentração de 100 ng/mL em DMEM



sem soro. As células foram mantidas nesse meio por 24, 48 e 72 horas e prosseguia-se para a contagem do número de células em câmara de Neubauer.

### **3.11. Análise estatística**

Todos os dados mostrados representam pelo menos três experimentos independentes e são expressos utilizando a média  $\pm$  o erro padrão da média (SEM). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6. Com o objetivo de avaliar a significância das diferenças observadas entre os grupos estudados foi realizado o procedimento de análise one-way ANOVA. O teste de comparação de médias utilizado foi o teste de Bonferroni. A significância estatística foi definida por valores de  $p < 0,05$ .

# **4.RESULTADOS**

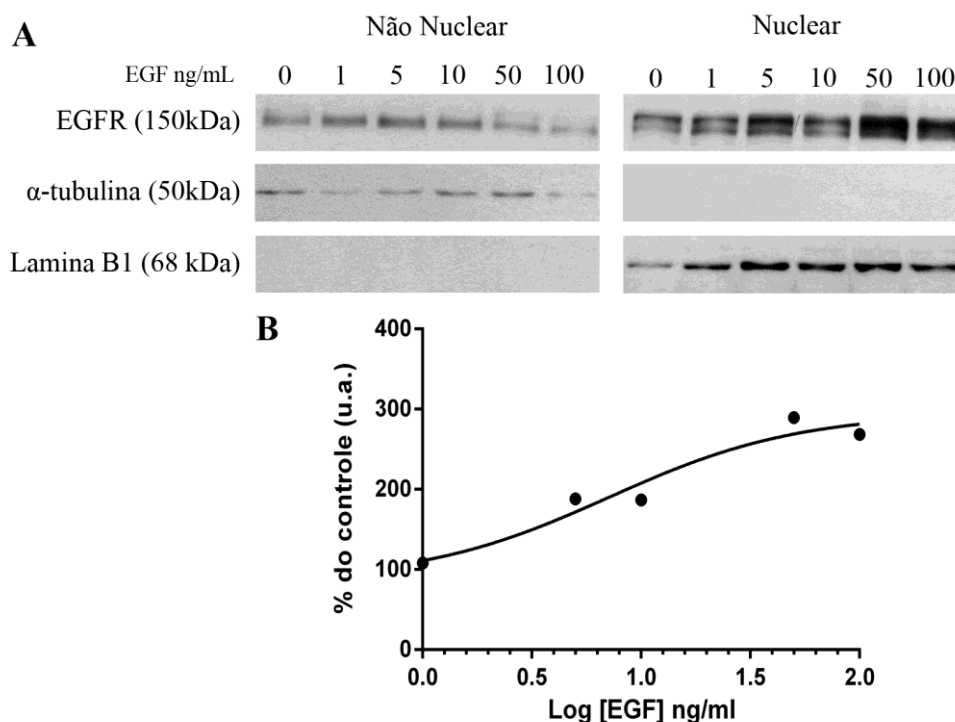
#### **4.1. O EGFR transloca para o núcleo de células SKHep-1 após estímulo com EGF, HB-EGF, $\beta$ -celulina e TGF- $\alpha$**

Para demonstrar a translocação do EGFR para o núcleo realizamos o fracionamento das células SKHep-1 seguido de análises de *western blot* das frações não nucleares e nucleares das células SKHep-1. Para isso, as células, previamente privadas de soro foram estimuladas com os ligantes EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina e TGF- $\alpha$  nas concentrações de 0 (controle não estimulado), 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL, por 10 minutos. As frações resultantes não nuclear e nuclear foram analisadas utilizando anticorpos anti-EGFR, anti- $\alpha$ -tubulina (proteína de localização citosólica) e anti-Lamina B1 (proteína constituinte do envelope nuclear). A ausência de  $\alpha$ -tubulina (50 kDa) na fração nuclear e Lamina B1 (68 kDa) na fração não nuclear é indicativo da pureza das respectivas frações. O anticorpo anti-EGFR utilizado reconhece a região carboxiterminal do EGFR, a qual compreende o domínio intracelular do receptor. Nos procedimentos de *western blot*, este anticorpo reconhece uma proteína que corresponde a uma banda de 150 kDa, referente 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.

Podemos observar que após estímulo com EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina e TGF- $\alpha$  houve uma redução gradativa da quantidade de EGFR total na fração não nuclear, em função do aumento da concentração do estímulo (Figura 3). Já na fração nuclear, a quantidade de EGFR total aumenta com o aumento da concentração do estímulo. A redução do EGFR total na fração não nuclear e seu aumento correspondente na fração nuclear sugerem a translocação do receptor para o núcleo após estímulo com esses ligantes.

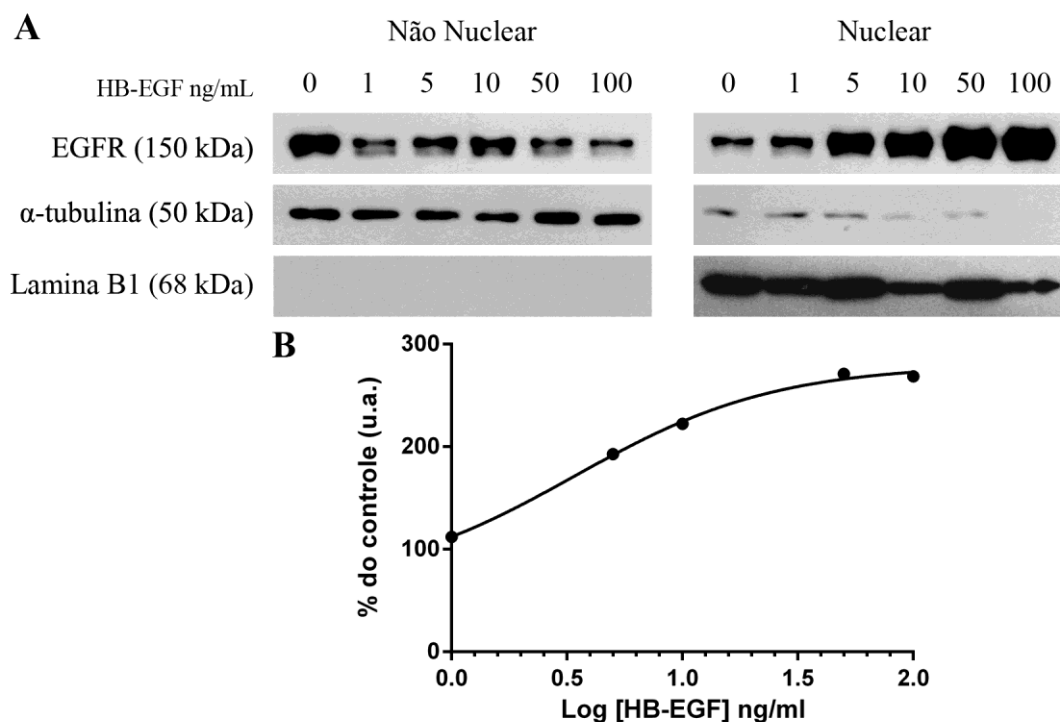
A Figura 3A é um *western blot* dos extratos celulares após estímulo com EGF. A detecção de EGFR no núcleo após estímulo das células SKHep-1 demonstra que houve translocação do EGFR para o núcleo. Os dados foram plotados em um gráfico (Figura 3B) que demonstra a análise após quantificação por densitometria, tendo as concentrações dos ligantes expressas na escala logarítmica e plotadas em relação ao controle não

estimulado e privado de soro; a curva apresentada é a que melhor representa os pontos gerados. Esse resultado foi obtido após a realização de três experimentos independentes.



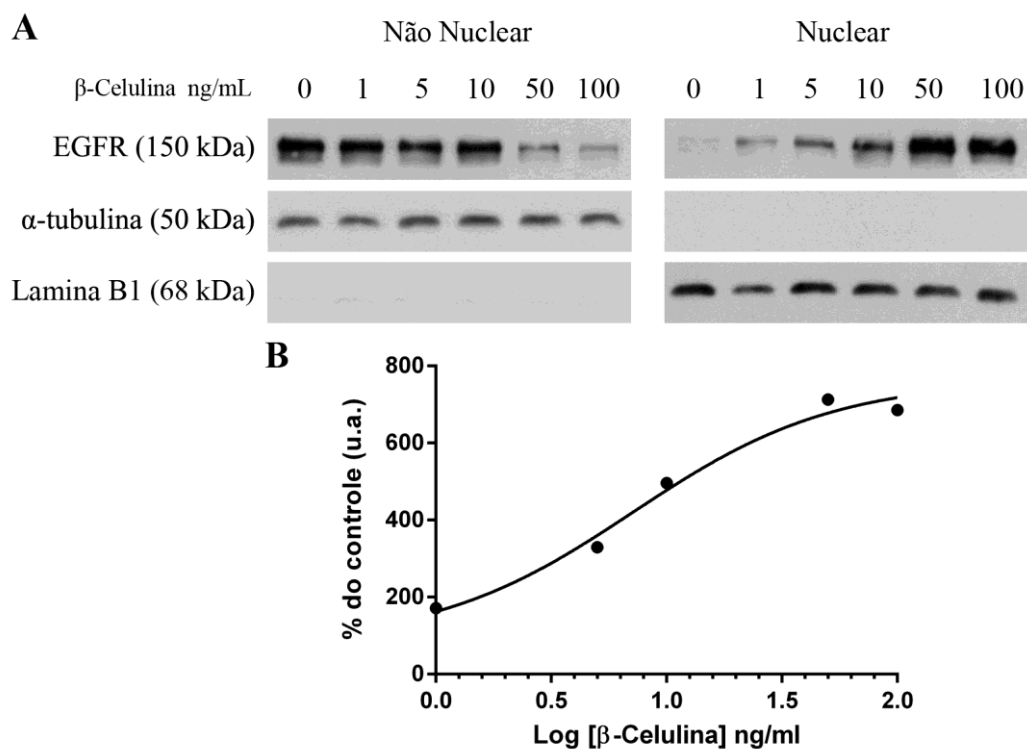
**Figura 3. EGF induz a translocação do EGFR para o núcleo de células SKHep-1.** *Western blot* dos extratos proteicos obtidos após o fracionamento celular. 30 $\mu$ g de proteínas foram resolvidas em gel de poli-acrilamida, e transferidas para membrana de PVDF. A. *Western Blot* após estímulo com EGF nas concentrações de 0 (controle não estimulado), 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL de EGF, por 10 minutos. Os anticorpos anti-EGFR, anti-Lamina B1 e anti- $\alpha$ -tubulina foram utilizados. B. As quantificações densitométricas foram analisadas em relação ao grupo controle e plotadas na escala logarítmica da concentração do ligante. Essa figura é representativa de três experimentos independentes.

A Figura 4 também é um experimento de *western blot* que demonstra que o EGFR é translocado para o núcleo de células SKHep-1 após estímulo com HB-EGF nas concentrações de 0 (controle não estimulado), 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL, por 10 minutos.



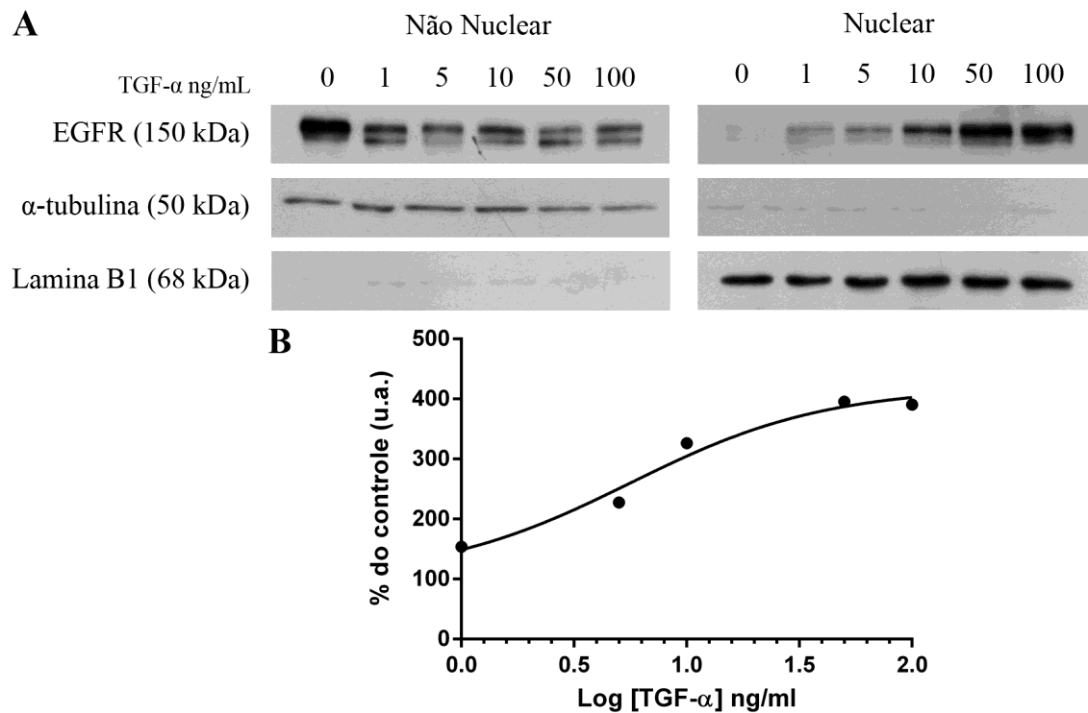
**Figura 4. HB-EGF induz a translocação do EGFR para o núcleo de células SKHep-1.** *Western blot* dos extratos proteicos obtidos após o fracionamento celular. 30 $\mu$ g de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida, e transferidas para membrana de PVDF. A. *Western blot* após estímulo com HB-EGF nas concentrações de 0 (controle não estimulado), 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL de HB-EGF, por 10 minutos. A membrana foi incubada com os anticorpos anti-EGFR, anti-Lamina B1 e anti- $\alpha$ -tubulina. B. As quantificações densitométricas foram analisadas em relação ao grupo controle e plotadas na escala logarítmica da concentração do ligante. A figura é representativa de três experimentos independentes.

O mesmo perfil de translocação do receptor foi obtido após o estímulo das células hepáticas com  $\beta$ -celulina nas concentrações de 0 (controle não estimulado), 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL, por 10 minutos (Figura 5). Os anticorpos anti- $\alpha$ -tubulina e anti-Lamina B1 apontam a ausência de contaminação nas frações celulares.



**Figura 5.  $\beta$ -celulina induz a translocação do EGFR para o núcleo de células SKHep-1.** *Western blot* dos extratos proteicos obtidos após o fracionamento celular. 30 $\mu$ g de proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida, e transferidas para membrana de PVDF. A. *Western blot* após estímulo com  $\beta$ -celulina nas concentrações de 0 (controle não estimulado), 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL de  $\beta$ -celulina, por 10 minutos. A membrana foi incubada com os anticorpos anti-EGFR, anti-Lamina B1 e anti- $\alpha$ -tubulina. B. As quantificações densitométricas foram analisadas em relação ao grupo controle e plotadas na escala logarítmica da concentração do ligante. Essa figura é representativa de três experimentos independentes.

Por fim, obtivemos que o ligante TGF- $\alpha$  também induziu a translocação do EGFR para o núcleo, após estímulo das células com 0 (controle não estimulado), 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL, por 10 minutos (Figura 6), e quanto maior a concentração de estímulo, maior a quantidade de EGFR detectado na fração nuclear.



**Figura 6. TGF- $\alpha$  induz a translocação do EGFR para o núcleo de células SKHep-1.** *Western blot* dos extratos proteicos obtidos após o fracionamento celular. 30 $\mu$ g de proteínas foram resolvidas em gel de poli-acrilamida, e transferidas para membrana de PVDF. A. *Western blot* após estímulo com TGF- $\alpha$  nas concentrações de 0 (controle não estimulado), 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL de TGF- $\alpha$ , por 10 minutos. Os anticorpos anti-EGFR, anti-Lamina B1 e anti- $\alpha$ -tubulina foram utilizados. B. O gráfico expressa as quantificações densitométricas analisadas em relação ao grupo controle não estimulado e plotadas na escala logarítmica da concentração do ligante. Essa figura é representativa de três experimentos independentes.

#### 4.2. Os ligantes EGF, HB-EGF, $\beta$ -celulina e TGF- $\alpha$ possuem diferentes valores de EC<sub>50</sub>

Os estudos funcionais com os agonistas do receptor EGFR permitem calcular o valor de EC<sub>50</sub> para os mesmos, isto é, o valor de concentração de um agonista capaz de produzir metade da resposta biológica máxima que este pode gerar numa determinada estrutura biológica. O EC<sub>50</sub> é uma medida de potência que permite seriar um conjunto de agonistas de um mesmo receptor estudado. O EC<sub>50</sub> é, por isso, uma medida de potências relativas e o valor de EC<sub>50</sub> dos agonistas é uma aferição de potência comparada e não de eficácia (Neubig, Spedding, Kenakin, & Chistopoulos, 2003).

Os valores de EC<sub>50</sub> para os ligantes de EGFR foram obtidos da análise de densitometria das bandas de EGFR, e resumidos na tabela abaixo:

Ligante	EC <sub>50</sub>
EGF	7,138 ng/mL
HB-EGF	3,418 ng/mL
β-celulina	7,184 ng/mL
TGF-α	5,618 ng/mL

**Tabela 2. Valores de EC<sub>50</sub> para os ligantes de EGFR.** O EC<sub>50</sub> foi calculado no software GraphPad, através dos dados de quantificação densitométrica das bandas de EGFR apresentados nos gráficos B das figuras 3, 4, 5 e 6.

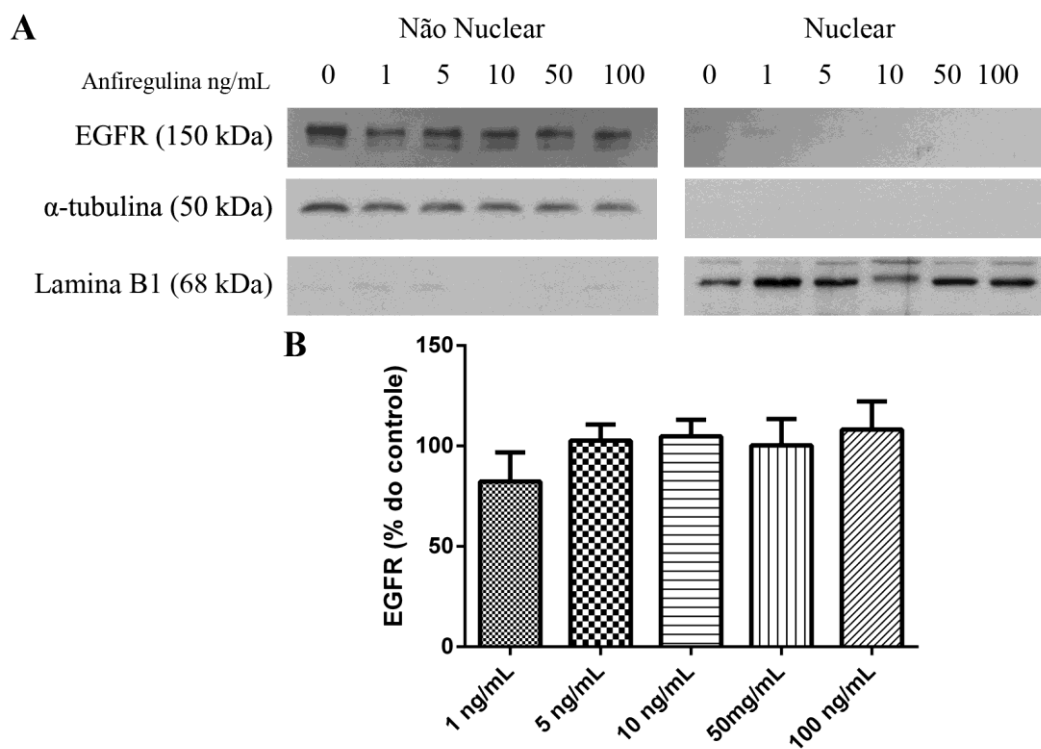
A análise dos valores de EC<sub>50</sub> aponta o HB-EGF como o ligante com maior taxa de translocação em uma menor concentração de estímulo, ou seja, estimulando-se as células SKHep-1 com este ligante na concentração de 3,4 ng/mL, 50% dos receptores de EGFR da células encontram-se translocados para o núcleo celular. Em seguida, o ligante que apresentou o segundo menor valor de EC<sub>50</sub> foi o TGF-α, a uma concentração de 5,6 ng/mL. Finalmente os ligantes EGF e β-celulina demonstraram valores de EC<sub>50</sub> similares, de aproximadamente 7 ng/mL.

#### **4.3. O EGFR não transloca para o núcleo após estímulo com anfiregulina e epiregulina**

A técnica de *western blot* foi novamente utilizada para analisar as frações celulares na presença de estímulo com anfiregulina e epiregulina. Diferentemente dos outros ligantes, não houve detecção do receptor EGFR nas frações nucleares das células estimuladas com estes ligantes (Figuras 7 e 8).

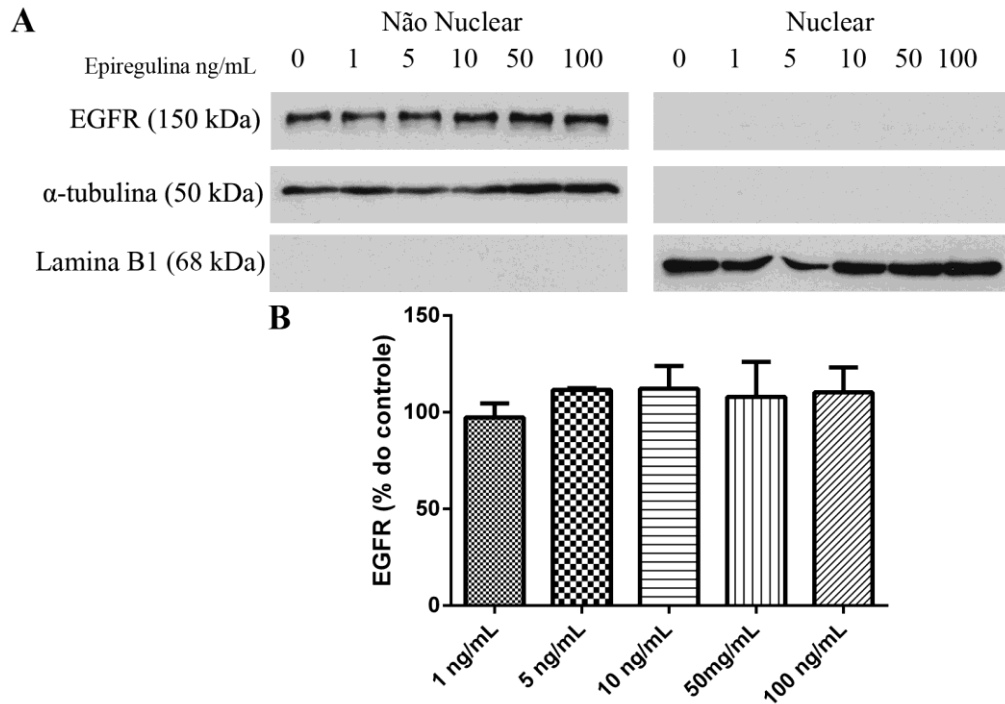
A quantificação da fração não nuclear por densitometria revela que a quantidade de EGFR nessa fração se mantém constante após estímulo com anfiregulina. Tal indício corrobora a observação de não translocação do receptor para o núcleo por este estímulo (Figura 7B)





**Figura 7. Anfirogulina não induz a translocação do EGFR para o núcleo de células SKHep-1.** *Western blot* dos extratos proteicos obtidos após o fracionamento celular. 30 $\mu$ g de proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida, e transferidas para membrana de PVDF. A. *Western Blot* após estímulo com anfirogulina nas concentrações de 0 (controle não estimulado), 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL de anfirogulina, por 10 minutos. Os anticorpos anti-EGFR, anti-Lamina B1 e anti- $\alpha$ -tubulina foram utilizados. B. Quantificação por densitometria da expressão de EGFR na fração não-nuclear. Não houve diferenças pela análise de variância, One way-ANOVA. A figura é representativa de três experimentos independentes.

O mesmo perfil foi observado para o ligante epiregulina, não havendo a detecção do receptor EGFR na fração nuclear. Além disso, a quantidade de EGFR na fração não nuclear mostrou-se constante, sem diferença significativa entre os grupos (Figura 8).



**Figura 8. Epiregulina não induz a translocação do EGFR para o núcleo de células SKHep-1.** *Western blot* dos extratos proteicos obtidos após o fracionamento celular. 30 $\mu$ g de proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida, e transferidas para membrana de PVDF. A. *Western Blot* após estímulo com epiregulina nas concentrações de 0 (controle não estimulado), 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL de epiregulina, por 10 minutos. Os anticorpos anti-EGFR, anti-Lamina B1 e anti- $\alpha$ -tubulina foram utilizados. B. Quantificação por densitometria da expressão de EGFR na fração não-nuclear. Não houve diferenças pela análise de variância, One way-ANOVA. A figura é representativa de três experimentos independentes.

Mesmo frente ao alto tempo de exposição do filme à membrana no processo de revelação não foi possível detectar a banda correspondente ao EGFR nas frações nucleares das células estimuladas com os ligantes anfiregulina e epiregulina. Os experimentos foram realizados em triplicatas e juntamente com um controle positivo, (estímulo com EGF 100 ng/mL), o qual apresentou a detecção do receptor na fração nuclear das células (dados não mostrados).

#### **4.4. Os ligantes de EGFR induzem a fosforilação diferencial nos resíduos da cauda carboxiterminal do EGFR**

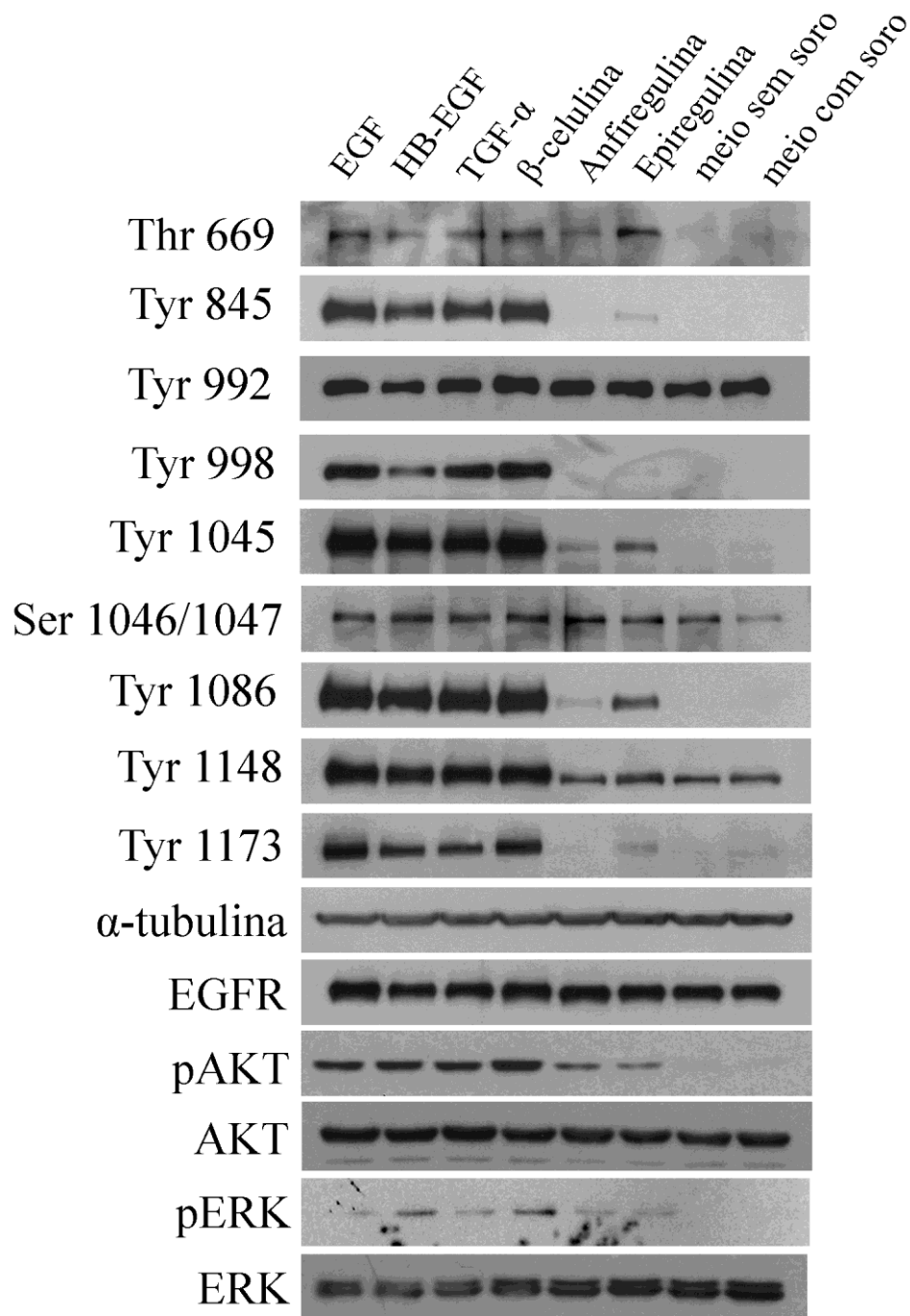
A ativação do EGFR ocasiona a autofosforilação em resíduos de tirosina específicos na porção carboxiterminal do receptor (CTD), o que resulta na ativação de efetores *downstream* (Bao et al., 2000). Existem mais de vinte sítios de fosforilação na CTD do EGFR (Y. Huang & Chang, 2011), que quando fosforilados servem como sítios de ligação para moléculas adaptadoras e sinalizadoras. Realizamos a análise dos extratos totais das células SKHep-1 após estímulo com os ligantes de EGFR na concentrações de 100 ng/mL por 10 minutos. Nove anticorpos específicos para os resíduos de tirosinas, serinas e treoninas fosforilados do EGFR foram utilizados. O perfil observado no *western blot* revela um padrão diferencial de fosforilação para os distintos ligantes do receptor (Figura 9).

Podemos observar que os ligantes EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina e TGF- $\alpha$ , em geral, fosforilam mais sítios na cauda carboxiterminal de EGFR quando comparados ao estímulo com anfiregulina e epiregulina e aos controles - meio com soro e meio sem soro. O anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina foi utilizado para demonstrar que todas as canaletas foram carregadas com a mesma quantidade de proteínas totais. Já o anticorpo anti-EGFR total demonstra que o tratamento com os ligantes não alterou a quantidade total deste receptor na célula. Os ligantes EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina e TGF- $\alpha$  estão relacionados à presença de todas as marcas de fosforilação avaliadas no nosso painel (Figura 9). Anfiregulina e epiregulina apresentam a marca de fosforilação no resíduo de tirosina 992 na mesma extensão que os demais grupos, inclusive os controles com soro e sem soro.

Anfiregulina e epiregulina apresentaram a detecção de alguns resíduos fosforilados como: treonina 669, tirosina 1045, serina 1046/1047, tirosina 1086 e tirosina 1148, em uma intensidade bem menor quando comparadas aos ligantes que geraram translocação do EGFR para o núcleo (EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$  e  $\beta$ -celulina). A intensidade da marca de fosforilação observada para o estímulo com epiregulina foi superior à apresentada por anfiregulina em alguns resíduos, e conforme a Tabela 3. Além disso, o ligante epiregulina mostrou

uma intensidade de fosforilação fraca para os resíduos de tirosina 845 e tirosina 1173, os quais não foram detectados nos extratos estimulados com anfiregulina.

Os anticorpos para as MAPK cinases AKT e ERK foram utilizados para avaliar a ativação de cascatas *downstream* pelos ligantes de EGFR. A proteína cinase AKT encontra-se fosforilada no resíduo de treonina 308 após estímulo com EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina e TGF- $\alpha$ , e em menor extensão, para anfiregulina e epiregulina. Adicionalmente, a proteína AKT não está fosforilada nos controles com soro e sem soro. A detecção da proteína AKT total demonstrou a presença desta proteína em todos os grupos analisados. A proteína ERK fosforilada foi detectada fracamente em todos os grupos estimulados com ligantes e não apareceu nos grupos controle com soro e sem soro. A detecção da proteína ERK total comprova a presença desta cinase, nas duas isoformas p42 e p44, nos extratos avaliados.



**Figura 9. Os ligantes de EGFR induzem a fosforilação diferencial dos resíduos presentes na cauda carboxiterminal do receptor EGFR.** *Western blot* dos extratos proteicos totais obtidos após estímulo com EGF, HB-EGF, β-celulina, TGF-α, anfiregulina e epiregulina na concentração de 100ng/mL, por 10 minutos. Os grupos controles compreendem as células mantidas em meio com soro e meio sem soro. 40μg de proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida, e transferidas para membrana de PVDF. As membranas foram incubadas com os anticorpos específicos para os diferentes resíduos de EGFR fosforilados, EGFR total, AKT, pAKT (T308), ERK 1/2 pERK 1/2 (T202/Y204) e α-tubulina. N=1

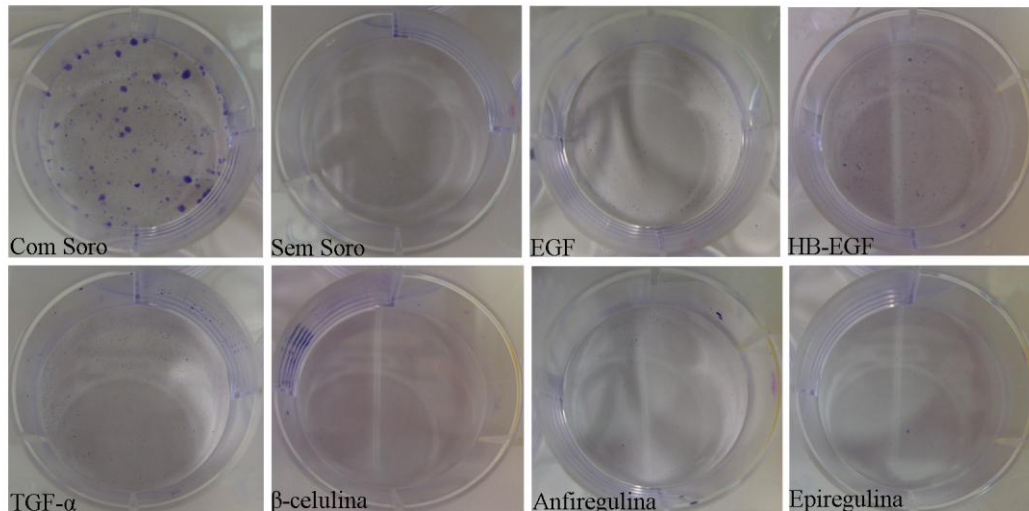
	Anfiregulina	Epiregulina
Thr 669	158.832	182.303
Tyr 845	70.006	76.482
Tyr 1045	131.211	152.137
Tyr 1086	101.179	147.365
Tyr 1173	94.433	115.075

**Tabela 3. Quantificação das bandas detectadas no imunoblot das células estimuladas com anfiregulina e epiregulina.** Quantificação por densitometria das marcas de fosforilação após estímulo com anfiregulina e epiregulina. Dados absolutos gerados no software ImageJ.

A detecção da ativação dos mediadores *downstream* da sinalização de EGFR, ERK e AKT após estímulo com anfiregulina e epiregulina comprovam a funcionalidade destes ligantes. Adicionalmente, a presença de marcas de fosforilação no receptor descarta a possibilidade de que tais ligantes estariam degradados ou modificados estruturalmente de modo a não gerarem a translocação de EGFR observada (Figura 7 e 8).

#### **4.5. Os ligantes de EGFR não induzem a formação de colônias nas células SKHep-1**

No ensaio de clonogenicidade, avalia-se os efeitos de qualquer tratamento na proliferação e sobrevivência, sendo as células plaqueadas em baixa densidade, o que permite analisar a capacidade de uma única célula em formar uma colônia. A privação de soro das células, no grupo sem soro, impediu a formação de colônias. Além disso, os estímulos diários com os ligantes de EGFR não propiciaram o desenvolvimento de colônias das células SKHep-1. Apenas o grupo controle mantido em meio com 10% de soro fetal bovino apresentou o desenvolvimento de colônias (Figura 10).



**Figura 10. Os ligantes de EGFR sozinhos, não induzem a formação de colônias nas células SKHep-1.** Células SKHep-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços e mantidas em meio sem soro suplementado diariamente com 100 ng/mL de EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina, TGF- $\alpha$ , anfiregulina e epiregulina. O grupo controle com soro foi mantido em meio suplementado com 10% de SFB. As células foram fixadas e coradas com cristal violeta. N=3

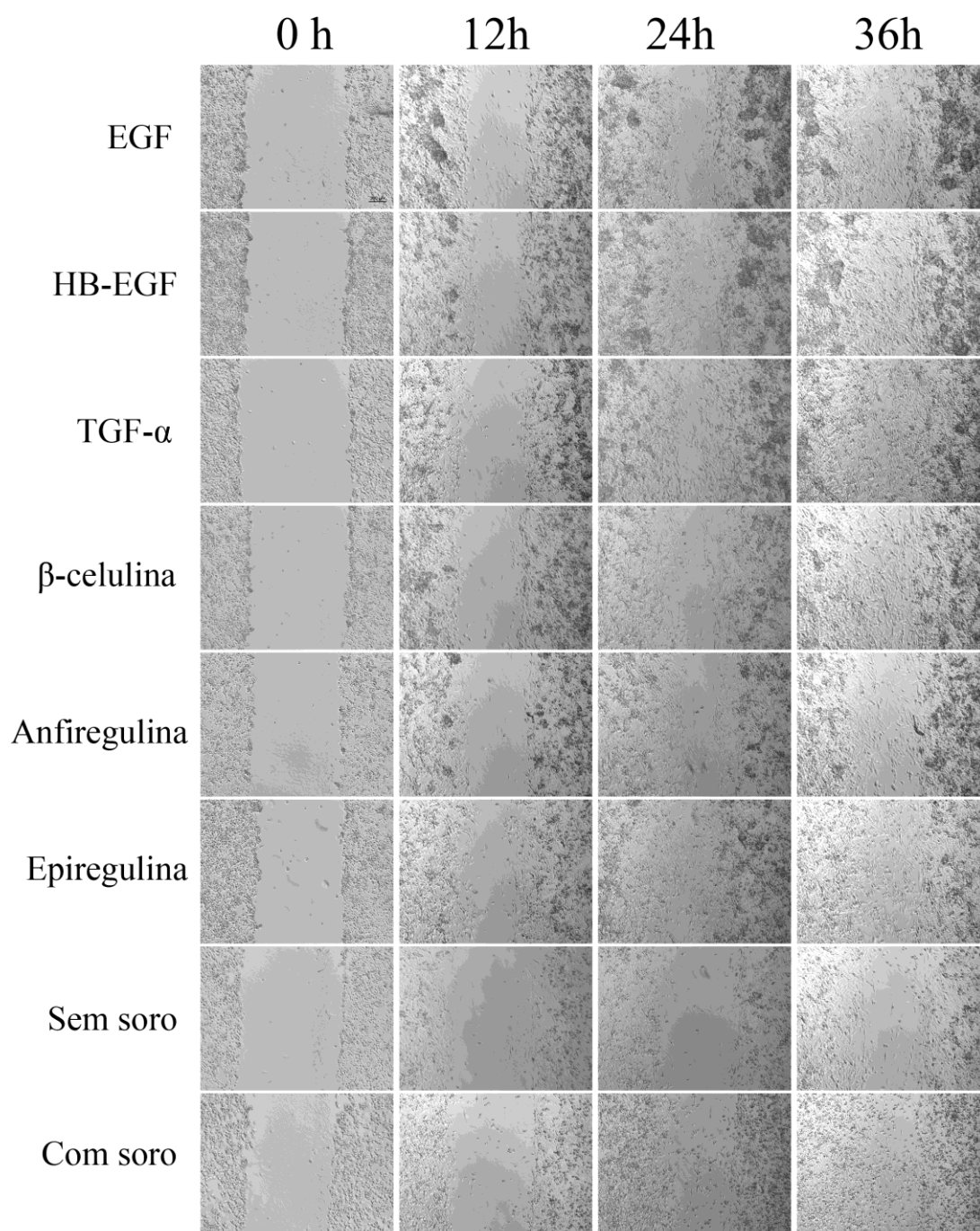
#### **4.6. Os ligantes de EGFR induzem a migração celular após “ferida” com eficiências distintas**

A cicatrização de feridas é um processo complexo e coordenado, que envolve ações como proliferação e migração e assim possibilita às células manter sua arquitetura, renovar tecidos e também reparar danos. A sinalização mediante ativação de EGFR está envolvida em processos fisiológicos normais que requerem movimento celular, assim como desregulação da resposta de motilidade em condições patológicas como na invasão de tumores (Lauffenburger & Horwitz, 1996).

Para demonstrar o preenchimento da “ferida” após estímulo com os ligantes de EGFR, realizamos um *scratch* ou “ferida” na monocamada confluenta de células SKHep-1. A cada 12 horas, as células foram fotodocumentadas para se avaliar a taxa de fechamento da “ferida”, tendo por tempo máximo 36 horas, período no qual a maioria das monocamadas celulares já se encontravam confluentes.

A análise quantitativa das imagens revela que os ligantes EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina, TGF- $\alpha$  e epiregulina foram eficientes em induzir a cicatrização da “ferida”, que fechou completamente após 36 horas de estímulo. O ligante anfiregulina não induziu o fechamento da “ferida”. (Figura 11 e 12).



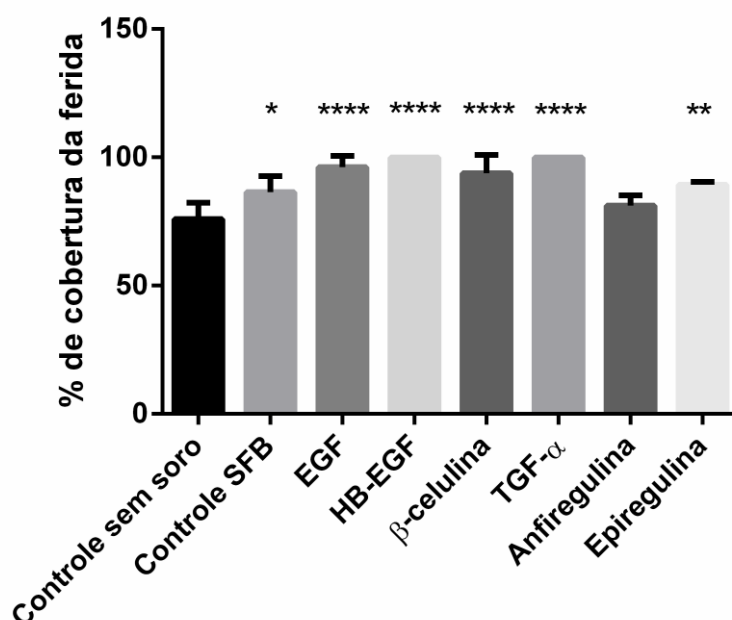


**Figura 11. Os ligantes de EGFR são eficientes em induzir a migração celular.** Após realização de uma ferida em uma camada de células confluentes, estas foram estimuladas com 100 ng/mL de EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina, TGF- $\alpha$ , anfiregulina e epiregulina. Os grupos controle compreendem células suplementadas com 10% de SFB (com soro) e privadas de soro (sem soro). As imagens foram coletadas na objetiva de 4X nos tempos 0, 12 horas, 24 horas e 36 horas. N=3

Foi realizada uma análise quantitativa da taxa de cobertura da “ferida”, utilizando o software Image J, no tempo 36 horas, para se aferir

comparativamente qual ligante induziu maior taxa de cobertura. Para a análise, levamos em conta a porcentagem de crescimento celular sobre essa área não coberta em relação à porcentagem da área sem células. Realizamos dois tipos de análises, uma em relação ao controle mantido em DMEM sem soro (Figura 12), e outra entre todos os grupos (Tabela 4).

Os ligantes EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina, TGF- $\alpha$  e epiregulina apresentaram uma maior taxa de migração celular em relação ao grupo controle, sem soro. O grupo mantido em meio com soro também diferiu quanto a taxa de fechamento da “ferida” em relação ao grupo sem soro (Figura 12).



**Figura 12. Os ligantes de EGFR induzem a migração celular.** A taxa de migração celular foi quantificada pelo software Image J e os dados foram plotados no GraphPad em relação ao controle sem soro. Com exceção de anfiregulina, os demais ligantes de EGFR diferem estatisticamente do controle sem soro. N=3 \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001

Quando comparamos o efeito de todos os ligantes entre si, observa-se que os ligantes EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina e TGF- $\alpha$  não diferiram entre si na capacidade de fechamento da “ferida”. Verifica-se diferença significativa entre os grupos HB-EGF e TGF- $\alpha$  em relação à epiregulina, assim como, para os ligantes EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina e TGF- $\alpha$  comparados à anfiregulina (Tabela 4).

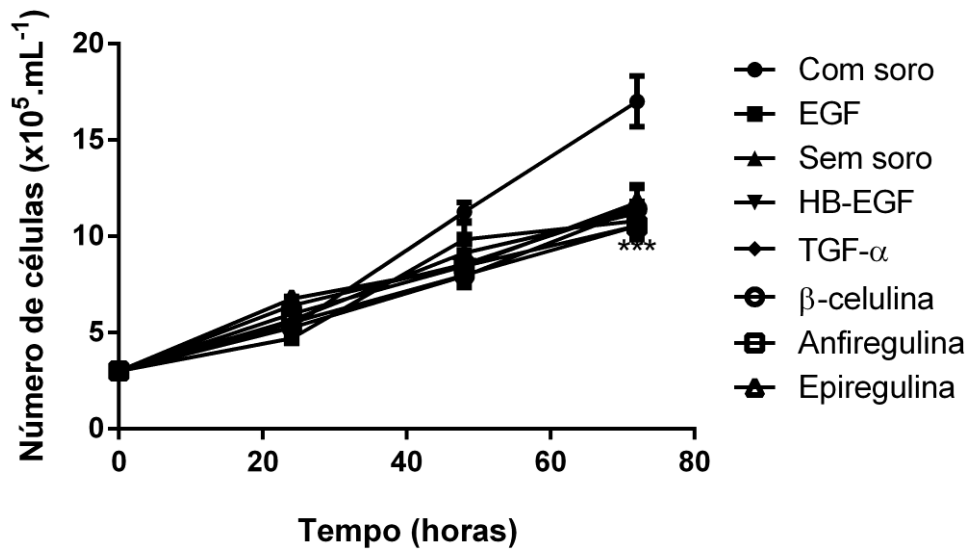
	EGF	HB-EGF	TGF- $\alpha$	$\beta$ -celulina	Anfiregulina	Epiregulina
EGF	X	Ns	ns	Ns	***	ns
HB-EGF	ns	X	ns	Ns	****	*
TGF- $\alpha$	ns	Ns	X	Ns	****	*
$\beta$ -celulina	ns	ns	ns	X	**	ns
Anfiregulina	***	****	****	**	X	ns
Epiregulina	ns	*	*	Ns	Ns	X

**Tabela 4. Comparação dos efeitos na migração celular de todos os ligantes entre si.** Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 6 utilizando o teste de Bonferroni para comparações múltiplas. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$

#### 4.7. Os ligantes de EGFR não alteram a taxa de proliferação celular em células SKHep-1

O EGFR sinaliza diversas vias de transdução de sinais que culminam na indução de genes como *ELK-1*, *c-MYC* e *c-FOS*, importantes para a proliferação celular. Neste sentido, realizamos uma quantificação de crescimento celular para avaliar o efeito dos ligantes de EGFR na proliferação das células SKHep-1.

A análise da curva de crescimento não aponta diferenças entre nenhum dos grupos de ligantes e o grupo sem soro para os períodos de 24 e 48 horas. Somente após 72 horas de experimento, verifica-se um maior número de células no grupo mantido em meio com soro comparado aos demais grupos. Deste modo, os ligantes de EGFR, per si, não foram capazes de estimular a proliferação desta linhagem celular mantida sem suplementação de soro.



**Figura 13. Curva de crescimento após estímulo das células SKHep-1 com os ligantes de EGFR.** Células SKHep-1 foram plaqueadas na concentração inicial de  $3 \times 10^5$  e então estimuladas diariamente com 100 ng/mL de EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina, TGF- $\alpha$ , anfiregulina e epiregulina. As células foram contadas nos períodos de 0, 24, 48 e 72 horas. Os dados foram plotados no GraphPad e analisados em relação ao grupo controle sem soro. N=3 \* $p < 0,05$

# **5.DISSCUSSÃO**

O EGFR tem sido relacionado com estados patológicos como o câncer, uma vez que atua como um sinalizador de sobrevivência e angiogênese, contribuindo para a progressão tumoral (Normanno et al., 2006). Recentemente, a detecção desse receptor no núcleo celular foi relacionada a um pior prognóstico para pacientes com câncer (Hui-Wen Lo, Xia, et al., 2005) além de causar resistência ao tratamento quimioterápico (D. Wheeler et al., 2008) e radioterápico (Yu et al., 2012). Embora a primeira detecção do EGFR nuclear tenha acontecido no início da década de 90 (Ulrich Marti et al., 1991), o primeiro estudo acerca das funções do EGFR nuclear só foi publicado dez anos mais tarde (Lin et al., 2001). Hoje, temos evidências sólidas de que o EGFR nuclear leva a um novo modo de sinalização, diferente da bem descrita e tradicional sinalização citosólica (Hui-Wen Lo, Xia, et al., 2005; H-W Lo & Hung, 2006)

Os principais estudos com o EGFR nuclear vêm sendo desenvolvidos principalmente em células derivadas de tumores de mama (Hui-Wen Lo, Xia, et al., 2005), ovário (Xia et al., 2009) e cavidade oral (Psyrris et al., 2008). Neste trabalho, optamos por utilizar uma linhagem de origem de adenocarcinoma hepático, uma vez que sinalização desencadeada pelo receptor EGFR apresenta relevância de destaque neste órgão, dada a alta capacidade proliferativa e regenerativa do mesmo. Essa escolha se baseou nos experimentos realizados na dissertação de mestrado de Ana Carolina De Angelis Campos, em 2010. A expressão de EGFR foi verificada em linhagens tumorais de mama (MACL-1, MGSO-3 e MDA-MB 231) e SKHep-1, sendo que somente esta última apresentou uma banda fortemente marcada na faixa de massa molecular esperada, aproximadamente 150 kDa (Campos, 2010). As células SKHep-1, células endoteliais derivadas do adenocarcinoma hepático humano, expressam altos níveis de EGFR funcional, e representam células com programação tumoral.

A ativação do EGFR e sua translocação para o núcleo se dá por meio da interação com seus ligantes, além de sinais e estímulos como irradiação, choque térmico e a substância cisplatina (Dittmann et al., 2005; Lin et al., 2001). Este trabalho foi o primeiro estudo a avaliar a translocação do EGFR

para o núcleo após estímulo com seis principais ligantes do também chamado ErbB-1.

A técnica de *western blot* foi utilizada para a maioria dos nossos experimentos, uma vez que se trata de uma metodologia que fornece resultados conclusivos de expressão do EGFR. Já o fracionamento celular, com obtenção de frações não nucleares e frações nucleares é uma excelente metodologia para acessar a localização do receptor. Dados anteriormente coletados por nosso laboratório demonstram que o receptor de EGF encontra-se ativo tanto nas frações nucleares quanto nas não nucleares, após estímulo com EGF, evidenciado pela presença de EGFR fosforilado (Tyr 1173) nessas frações (Campos, 2010). Além disso, o controle experimental mediante a detecção de proteínas de localização subcelular definida e restrita a um compartimento torna possível a comprovação da pureza das frações obtidas. Os anticorpos controles utilizados neste trabalho reconhecem as proteínas estruturais:  $\alpha$ -tubulina, localizada no citosol, e Lamina-B1, uma proteína da membrana interna do envelope nuclear. Adicionalmente, a utilização da técnica de *immunoblot* possibilita uma análise de quantificação do conteúdo de receptor nas diferentes frações celulares.

A translocação do EGFR foi avaliada após 10 minutos de estímulo com os ligantes. Esse tempo foi escolhido por meio da análise de experimentos prévios realizados em nosso laboratório que demonstraram que este era o tempo de estímulo com EGF onde ocorria o pico de translocação do receptor (Campos, 2010). Paralelamente, o tempo de 20 minutos de estímulo não diferiu significativamente do estímulo de 10 minutos. Entretanto, alguns trabalhos demonstram que a partir do estímulo de 15 minutos, tendo o pico em aproximadamente 45 minutos, o EGFR começa a ser reciclado de volta para a membrana plasmática, por meio da interação com exportinas (Hui-Wen Lo et al., 2006). Mas ainda não há um consenso nos dados que definem o tempo de estímulo com o ligante no qual o EGFR começa a ser reciclado. Além disso, o pico de translocação parece ser diferente entre modelos celulares distintos.

Para a escolha das concentrações de ligante utilizadas no estímulo, realizamos um experimento piloto (dados não mostrados) abrangendo as concentrações 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 ng/mL dos ligantes. A concentração de 200 ng/mL é tida como um valor muito alto e acima da condição fisiológica, por isso não foi utilizada. Concentrações intermediárias, como a de 2,5 ng/mL, 25 ng/mL e 75 ng/mL foram excluídas dos próximos experimentos por apresentarem resultados muito semelhantes com seus valores anteriores ou posteriores, e não foram então consideradas concentrações relevantes.

Através das técnicas de fracionamento e *western blot* foi demonstrado que o estímulo com os ligantes EGF, TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ -celulina e HB-EGF foi capaz de induzir a internalização e a translocação nuclear do EGFR em células SKHep-1 (Figuras 3, 4, 5 e 6). A localização do EGFR no interior do núcleo após estímulo com EGF já foi confirmada com a reconstrução tridimensional de células SKHep-1 (De Angelis Campos et al., 2011), por meio de microscopia confocal, onde há a demonstração de que o receptor e o ligante encontram-se entre os limites da membrana interna do envelope nuclear, demarcados pelo anticorpo Lamina B1. Ainda existe a controvérsia se o EGFR encontra-se na forma solúvel distribuído pelo núcleo, ou ancorado à membrana, dado a sua porção transmembrana hidrofóbica. Nossos dados não são suficientes para responder essa pergunta, e tem-se a necessidade do uso de técnicas mais apuradas para demonstrar a localização subnuclear do receptor.

Nossos experimentos demonstram claramente que há uma diminuição da quantidade do receptor EGFR no citosol à medida que há o aumento da concentração dos ligantes (Figura 3), ao passo que havia aumento da concentração do receptor no núcleo, também conforme aumento da concentração de estímulo. A diminuição do EGFR na fração citosólica muitas vezes não é vista nos resultados de curva de translocação. Este resultado costuma ser explicado com base na quantidade muito alta de EGFR presente anteriormente na fração não nuclear da célula e da concentração de proteínas nucleares após se realizar a separação dessa fração. Mas entendemos que a alta exposição do filme na membrana, ou alto tempo de revelação em demais



métodos pode causar saturação das bandas da fração não nuclear. Salientamos que ambas as frações do nosso estímulo (não nuclear e nuclear) foram reveladas conjuntamente, em um mesmo filme, e com o mesmo tempo de exposição, de modo a evitar dúvidas interpretações dos dados.

A translocação do EGFR para o núcleo foi comprovada pela observação da movimentação deste receptor sem o estímulo e após o estímulo com ligantes. Mesmo sendo uma observação indireta e relativa, a análise densitométrica das bandas proteicas obtidas no *immunoblot* permitiu concluir que à medida que as células eram estimuladas com os ligantes EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$  e  $\beta$ -celulina, houve uma diminuição na quantidade do receptor EGFR na fração não nuclear diretamente relacionada com um aumento na quantidade do mesmo na fração nuclear (Figuras 3, 4, 5 e 6). Tal fato é um indicativo de movimento do receptor de um compartimento ao outro.

Os ligantes anfiregulina e epiregulina não promoveram a translocação nuclear do EGFR, como definido pela ausência de bandas na fração nuclear destes fracionamentos (Figuras 7A e 8A). Um controle positivo foi integrado ao experimento com esses dois ligantes, consistindo no estímulo das células com o ligante EGF (100 ng/mL). Os resultados apontam a detecção do receptor EGFR na fração nuclear, assim como a diminuição da intensidade da banda na fração não nuclear para este grupo estimulado com EGF (dados não mostrados). Realizamos a alta exposição do filme à membrana da fração nuclear dos estímulos anfiregulina e epiregulina e mesmo assim não foram detectadas quantidades significativas do receptor EGFR no núcleo. Outra comprovação da ausência de translocação nuclear do receptor é o resultado da quantificação por densitometria das bandas da fração citosólica, que revela que as mesmas mantiveram-se constantes, não apresentando diferenças estatisticamente significante entre os grupos (Figuras 7B e 8B).

Uma explicação plausível para este resultado se baseia na afinidade desses ligantes pelo EGFR, sendo que os ligantes epiregulina e anfiregulina se enquadram nos que possuem as mais baixas afinidades ao EGFR, epiregulina possuindo uma afinidade maior que anfiregulina (Sanders et al., 2013). Além

disso, a constante de dissociação desses ligantes assumem valores acima de 100 nM (Jones et al., 1999). Estes dados são relevantes, uma vez que a dimerização e ativação do EGFR só acontece após interação com o seu agonista, e assim um ligante com alta constante de dissociação pode recrutar menos parceiros para a dimerização.

Os valores de  $EC_{50}$  para os ligantes EGF, TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ -celulina e HB-EGF foram analisados para dispor de modo quantitativo a potência de cada ligante sobre o processo de translocação. O HB-EGF foi o ligante com o menor valor de  $EC_{50}$  (3,4 ng/mL), seguido do TGF- $\alpha$  (5,6 ng/mL), e o EGF e a  $\beta$ -celulina, apresentaram valores muito semelhantes (7,1 ng/mL). Uma vez que o HB-EGF foi o ligante que gerou maior taxa de translocação com uma menor concentração de estímulo, pode-se inferir que este ligante possui maior potência de translocação.

É bem estabelecido que o domínio carboxiterminal do EGFR é importante para a internalização do mesmo, mais especificamente os resíduos de tirosina localizados nessa região. Muitos trabalhos realizam mutações específicas em resíduos de tirosina, para então analisar sua importância dentro da diversa sinalização de EGFR. Mas a maioria desses trabalhos utiliza apenas o EGF como estímulo para a ativação desse receptor, ou até mesmo processos como irradiação. O *screening* de resíduos fosforilados após estímulo com ligantes distintos é o passo inicial para a determinação dos resíduos-chave envolvidos no processo de translocação.

Foram realizados alguns trabalhos com mutantes de EGFR, obtendo uma forma truncada para alguns resíduos específicos. Os mutantes do receptor para os resíduos de Tyr 991 e Tyr 973 não afetam a internalização do EGFR, ao passo que no mutante para Tyr 958 o receptor não é internalizado (Chang et al., 1993). Além disso, as trocas simultâneas nos resíduos de tirosinas 992, 1068, 1086, 1148 e 1173 para resíduos de fenilalanina reduzem significativamente a internalização do receptor (Sorkin, Helin, Waters, Carpenter, & Beguinot, 1992; Sorkin, Waters, Overholser, & Carpenter, 1991). Tais dados corroboram o perfil de fosforilação dos resíduos de tirosina obtidos

após estímulo com os ligantes (Figura 9). Alguns dos resíduos mencionados acima, como Tyr 1173 não se encontram fosforilados ou estão subfosforilados, como é o caso de Tyr 1086 e Tyr 1148, após estímulo com os ligantes anfiregulina e epiregulina. Interessantemente, estes ligantes não promoveram a translocação nuclear de EGFR (Figuras 7 e 8). Tal inferência salienta a importância da associação destas marcas de fosforilação para a translocação nuclear. Mais especificamente, e em semelhança com os resíduos mencionados acima, Tyr 1086 e Tyr 1148 encontram-se menos fosforiladas após estímulo com anfiregulina e epiregulina, quando comparados aos demais ligantes de EGFR, e o resíduo Tyr 1173 não foi fosforilado após estímulo com esses dois ligantes.

Mutações nos sítios de fosforilação de tirosinas 1068 e 1086 em células PAE anulam completamente a internalização do receptor nessas células. Esses sítios são conhecidos por sua interação com a proteína adaptadora Grb2, que parece participar dos primeiros estágios de internalização (Jiang, Huang, Marusyk, & Sorkin, 2003). Faz-se necessário analisar o perfil de fosforilação do resíduo Tyr 1068 na presença dos ligantes de EGFR para verificar se o mesmo se encontra subfosforilado após estímulo com os ligantes epiregulina e anfiregulina, assim como ocorre para Tyr 1086 (Figura 9). Tal análise permitirá avaliar a importância desse sítio de fosforilação para a translocação do EGFR.

Mutação no resíduo Tyr 992 unicamente, no contexto de toda extensão da estrutura do EGFR, não afeta a internalização do receptor, ou sua atividade cinase frente à PLC $\gamma$ . A fosforilação no resíduo Tyr 992 possibilita a ligação de PLC $\gamma$  ao EGFR, e mutação neste resíduo não altera a ligação dessa proteína ao receptor. O resíduo de tirosina 992 é considerado um sítio minoritário para o EGFR e suspeita-se que ele pode agir como um regulador compulsório, na ausência de sítios de fosforilação majoritários do EGFR (Sorkin et al., 1992). Esses dados suportam nossos resultados, os quais revelam o mesmo perfil de fosforilação deste resíduo após estímulo com todos os ligantes analisados.

Mutações de substituição de tirosina por fenilalanina, que inibem a fosforilação em Tyr 998, não impedem a colocação de EGFR com ERK e a

consequente ativação de sua sinalização, mas diminuem a internalização induzida por EGF. Além disso, esse mutante tem menor interação com c-cbl, da via de degradação do EGFR (Tong, Taylor, Peterman, Prakash, & Moran, 2009).

A degradação de EGFR é mediada pela interação com ubiquitina ligase/c-cbl. A enzima c-cbl se liga diretamente ao resíduo de tirosina 1045 fosforilado, o que resulta em ubiquitinação do EGFR e degradação do receptor nos proteassomos. Wilson e colaboradores demonstraram que o estímulo com anfiregulina nas células MCF10A e célula mieloide 32D/EGFR não gerava fosforilação do resíduo Tyr 1045, diferentemente do estímulo com EGF (Wilson et al., 2012). Este mesmo perfil é observado nas células SKHep-1 estimuladas com EGF e anfiregulina (Figura 9). Essa diferença de acoplamento com a via de ubiquitinação parece explicar a disparidade entre a atividade intrínseca de anfiregulina e EGF. Em adição, alguns trabalhos feitos na linhagem celular PAE também apontam que a modificação de tirosina 1045 parece não ser necessária ao processo de endocitose do receptor, uma vez que a mutação desse resíduo resulta em ubiquitinação comprometida do receptor, mas não afeta a sua internalização (Grøvdal, Stang, Sorkin, & Madshus, 2004; F. Huang, Goh, & Sorkin, 2007; Jiang et al., 2003). Dado estes resultados, assume-se que a tirosina 1045 parece não ser um resíduo primordial para translocação do EGFR.

Não existem estudos que correlacionam o estado de fosforilação do resíduo de tirosina 845 e o processo de translocação nuclear do receptor. Somente alguns modelos relacionam a importância deste sítio para sinalização do EGFR. Por exemplo, estudo feito em vários tumores de origem hepática demonstrou que EGFR encontra-se fosforilado no resíduo Tyr 845 (Kannangai, Sahin, & Torbenson, 2006). Já em carcinoma de células escamosas bucais, a marca de fosforilação em Tyr 845 é considerada um fator de baixo prognóstico, estando a fosforilação deste resíduo positivamente correlacionada a respostas negativas à quimioterapia (Aquino et al., 2012). O quadro de marcas de fosforilação na cauda carboxiterminal de EGFR indicou a fosforilação de Tyr 845, após estímulo com EGF, TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ -celulina e HB-EGF (Figura 9). Contudo,

para positivamente correlacionar a fosforilação desse resíduo com o processo de translocação nuclear do EGFR faz-se necessários outros experimentos, como a abordagem de mutação sítio específica.

A sinalização desencadeada pelo resíduo de tirosina 1173 leva à ativação de PLC $\gamma$ , através da interação com Shc, onde ambos estão envolvidos na ativação da via *downstream* das MAPK. Neste sentido, a fosforilação nesse resíduo está correlacionado com um prognóstico negativo para pacientes com câncer de células não pequenas do pulmão (NSCLC) e tratados com inibidores de tirosina cinase (Fen Wang et al., 2012). Tratamento com EGF e TGF- $\alpha$  em células MCF-7 leva à fosforilação desse resíduo de tirosina (Vivacqua et al., 2009), o que está em concordância com nossos resultados (Figura 9). Em contrapartida, o estímulo das células SKHep-1 com os ligantes anfiregulina e epiregulina não resultou na fosforilação desse resíduo, o que pode estar correlacionado com a fraca interação desses ligantes com o receptor.

Outro resíduo que interage com a proteína adaptadora Shc é o resíduo de tirosina 1148. Este sítio encontra-se subfosforilado nos nossos controles, assim como nas células estimuladas com anfiregulina e epiregulina (Figura 9). Mutação nesse resíduo em queratinócitos humanos reduz a translocação nuclear em aproximadamente 70%, o mesmo acontecendo para mutação no resíduo de Tyr 1173. Em adição, superexpressão da fosfatase RPTP- $\kappa$ , que especificamente desfosforila alguns resíduos de tirosinas do EGFR, diminui a taxa de translocação do EGFR após estímulo com UV. Sugere-se que a região que engloba os resíduos 1148 e 1173 é crítica para a translocação nuclear, e a proteína Shc pode estar envolvida nos mecanismos do envio de EGFR para o núcleo (Y. Xu, Shao, Voorhees, & Fisher, 2009).

Além da fosforilação dos resíduos de tirosinas, o receptor EGFR pode ser fosforilado em alguns resíduos de serina e treonina. Sabe-se que após estimulação com EGF, EGFR é fosforilado no resíduo de treonina 669 (Heisermann & Gill, 1988). Fosforilação nesse resíduo parece estar correlacionado com a indução de ativação da cinase ERK (Y. Huang & Chang, 2011; X. Li, Huang, Jiang, & Frank, 2008). Já o resíduo de serina 1046/1047

parece estar relacionado com eventos de regulação negativa da sinalização do EGFR, incluindo dessensibilização e regulação negativa da via com o objetivo de preparo para estímulos posteriores (Countaways, Nairng, & Davis, 1992; Yamauchia et al., 2001). No nosso estudo, o resíduo de serina 1046/1047 mostrou-se fosforilado de modo similar para todos os ligantes, assim como observado para o resíduo de treonina 669 (Figura 9).

A via de Ras, sabidamente parte das cascatas do EGFR, é uma via importante na regulação da produção dos ligantes de EGFR e contribui assim para os mecanismos de ativação autócrina deste receptor. Ras estimula a via das MAPKs, que por fim ativam ERK1/2 e uma vez que ERK1/2 encontra-se fosforilada resulta em proliferação aumentada (Schulze, Lehmann, Jefferies, McMahon, & Downward, 2001). Em nossos experimentos houve ativação ERK em todos os grupos estimulados com ligantes, sendo que os ligantes HB-EGF e  $\beta$ -celulina apresentaram maior atividade. Além disso, como esperado, não houve fosforilação de ERK nos grupos controle com soro e sem soro (Figura 9).

Neste sentido, a ativação de outro alvo efetor *downstream* da via de EGFR, AKT, também foi avaliada. Os diferentes ligantes de EGFR promoveram a fosforilação de AKT, sendo observada uma marcação mais fraca neste sítio nas células estimuladas com anfiregulina e epiregulina (Figura 9). A ativação de AKT ocorre diretamente através de PI3K, não havendo necessidade de presença de RAS-GTP (Toulany, Baumann, & Rodemann, 2007). Vale mencionar que a sinalização via PI3K dependente de EGFR é importante para promover sobrevivência celular em resposta a fatores exógenos de estresse, como exposição à radiação, usual no tratamento de câncer (T. Kim, Lee, Song, & Choi, 2006) e que expressão alterada ou mutação nos componentes dessa via estão implicados no câncer humano (Vivanco & Sawyers, 2002). A expressão de AKT total em nossos extratos foi a mesma para todos os grupos (Figura 9).

De um modo geral, postula-se que o ligante anfiregulina funcione como agonista parcial para dimerização do EGFR, uma vez que induz somente metade da dimerização do receptor comparada aos ligantes EGF, TGF- $\alpha$ , HB-

EGF e  $\beta$ -celulina. Assim, as diferenças nas respostas biológicas aos diferentes ligantes podem ser resultado do agonismo parcial para a formação dos dímeros (Macdonald-Obermann & Pike, 2014). Essa conclusão pode ser extrapolada, também para o ligante epiregulina, o qual possui menor afinidade pelo EGFR comparada aos demais ligantes.

Após a realização do *screening* das marcas de fosforilações associadas aos ligantes, foi possível detectar alguns dos resíduos na cauda carboxiterminal do EGFR que podem ser considerados candidatos para a participação no processo de translocação desse receptor, sendo estes os resíduos de tirosina 998, 1086, 1148 e 1173. Assim, poderemos partir para o segundo passo do projeto, que inclui a realização de mutações sítio dirigidas nestes resíduos para a realização de ensaios funcionais.

Dano ao tecido é comumente causado por doenças crônicas ou agudas, lesões acidentais, procedimentos cirúrgicos ou câncer. Diversas estratégias e fatores são requeridos para reparar esse dano. A comunicação célula a célula usando transdução de sinais direta ou moléculas sinalizadoras é importante para a função celular regenerativa (Nimni, 1997), e os fatores de crescimento possuem papel importante na produção de tecido, regeneração e diferenciação durante a cicatrização de “ferida” (Imanishi et al., 2000).

Segundo a literatura atual, dentre todos os ligantes de EGFR, os principais envolvidos no ensaio de “*wound healing*” são EGF, TGF- $\alpha$  e HB-EGF (Barrientos, Stojadinovic, Golinko, Brem, & Tomic-Canic, 2008) e a maioria dos estudos abordando o ensaio de “*wound healing*” após ativação do receptor EGFR utilizam apenas o ligante EGF como ativador (Peplow & Chatterjee, 2013). Além disso, nenhum estudo comparou o efeito de seis ligantes de EGFR para a migração utilizando este ensaio e uma única linhagem celular.

Em nossos experimentos mostramos a importância da função dos ligantes EGF, TGF- $\alpha$  e HB-EGF na migração celular, acrescidos da estimulação também gerada pelos ligantes  $\beta$ -celulina e epiregulina. Os ligantes EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF e  $\beta$ -celulina foram eficientes em induzir o fechamento da “ferida”,

mas não apresentaram diferenças entre eles, inviabilizando a estratificação dos ligantes e a relação de “potência” entre eles (Figura 11 e 12).

Os grupos HB-EGF e TGF- $\alpha$  foram os mais eficientes na ação de cicatrização de “ferida” quando comparados à epiregulina. Já EGF, HB-EGF,  $\beta$ -celulina e TGF- $\alpha$  foram, comparativamente mais potentes que o ligante anfiregulina (Figuras 11 e 12).

Esses dados são explicados através da pronta estimulação autócrina e parácrina de alguns fatores após dano ao tecido. Fluido coletado de ferida realizada em suínos foi analisado quanto à composição de fatores e observou-se que HB-EGF foi prontamente secretado no dia seguinte ao dano, alcançando seus níveis máximos em 2-3 dias, e voltando aos níveis basais junto com a cicatrização da “ferida”. Observou-se em seguida que HB-EGF é um potente mitógeno para queratinócitos e fibroblastos (Marikovsky et al., 1996).

Além disso, células ARPE-19, células epiteliais pigmentadas da retina, realizam cicatrização da “ferida” espontaneamente no meio basal e adição exógena de HB-EGF (50 ng/mL) aumenta a velocidade do fechamento da mesma. Esse processo é dependente de proliferação celular e migração celular, pois tratamento das células com inibidor de proliferação hidroxuréia bloqueia apenas parte da cicatrização. Essas células foram analisadas quanto à ativação do EGFR, sendo observada a ativação por fosforilação do resíduo de Tyr 845, além de fosforilação das cinases Erk e Akt (K.-P. Xu & Yu, 2007).

A função principal do EGF no reparo de dano ao tecido é induzir a proliferação e migração de queratinócitos, e existem muitos estudos centrados nesta função (Hardwicke, Schmaljohann, Boyce, & Thomas, 2008; Peplow & Chatterjee, 2013). O EGF possui diversas funções na cicatrização de feridas em diversos tipos de tecidos epidermais. Mas a baixa concentração de EGF nos sítios alvo é resultado de sua rápida meia vida e rápida difusão na célula (Hardwicke et al., 2008). A concentração de EGF é aumentada após injúria aguda, acelerando a reepitelialização (Brown et al., 1986). Em experimentos *in vitro* com queratinócitos humanos, tratamento com EGF (100 ng/mL) acelera a



taxa de migração celular e a cicatrização da ferida quando comparados ao grupo controle (Haase, Evans, Pofahl, & Watt, 2003).

O ligante TGF- $\alpha$  também gera indução da cicatrização da ferida em alguns modelos celulares (Koivisto, Jiang, Häkkinen, Chan, & Larjava, 2006). Em queratinócitos humanos, o TGF- $\alpha$  é mais eficiente no fechamento da ferida que o ligante EGF (Cha, O'Brian, O'Toole, Woodley, & Hudson, 1996), mostrando-se mais potente que o EGF na estimulação de células imortalizadas do epitélio da córnea (McClintock & Ceresa, 2010).

Poucos trabalhos demonstram a participação do ligante  $\beta$ -celulina na cicatrização de "feridas". Experimentos *in vitro* em células epiteliais da córnea demonstraram a  $\beta$ -celulina é mais efetiva que os ligantes EGF, TGF- $\alpha$  e HB-EGF em promover fechamento da ferida. Entretanto, nos dados *in vivo*, o único ligante efetivo em curar a ferida foi o EGF (Peterson, Phelps, Doll, Schaal, & Ceresa, 2014).

Em suma, podemos observar que há uma grande variação das respostas nos diversos estudos funcionais realizados, dependendo do tipo celular, da concentração do ligante utilizado e também se o modelo utilizado é *in vitro*, como cultura de células, ou *in vivo*, através da realização de feridas em animais, ou até da quantificação dos fatores liberados após dano ao tecido.

Discute-se ainda se a cicatrização de feridas nos modelo *in vitro* é devida à migração celular ou a proliferação. Mesmo que a estimulação do receptor EGFR possa levar a proliferação e migração, estas respostas são separadas e dependentes de vias distintas (Chen, Xie, Sekar, Gupta, & Wells, 1994). Muitos trabalhos demonstram que a via PLC $\gamma$  ativada por EGFR está relacionada com a motilidade, pois a inativação dessa enzima inibe o movimento celular (Chen, Xie, et al., 1994). Em células NR6 (fibroblastos murinos) expressando mutantes de EGFR para vários resíduos verificou-se que a motilidade celular é dependente da atividade de cinase do receptor e da presença de pelo menos um sítio fosforilado, o resíduo de tirosina 992 (Chen, Gupta, & Wells, 1994). Em nosso trabalho, tal sítio apresenta o mesmo perfil de fosforilação após estimulação com todos os ligantes (Figura 9), o que sugere a dependência de

outros resíduos que acoplam a ativação de PLC $\gamma$  ou até mesmo a ativação de outras vias de sinalização mediada pela sinalização do EGFR.

A privação de soro na cultura de células SKHep-1 reduziu a capacidade dessas células proliferarem e formarem colônias. Estes experimentos funcionais revelam que apenas o estímulo com o ligante não é suficiente para induzir respostas como proliferação e formação de colônia nas células SKHep-1 (Figura 10 e 14).

Muitas células cancerosas são resistentes à quimioterapia em razão da atividade biológica das suas células vizinhas, ou do contexto do seu microambiente. Por exemplo, foi observado que células estromais resgatavam tumores da toxicidade induzida por drogas secretando fatores de crescimento que impediam a ativação das vias apoptóticas (Straussman et al., 2013). Essas interações, podem ser possíveis pela justaposição de monoculturas e co-culturas *in vitro*. Células de adenocarcinoma de mama (SK-BR-3) são sensíveis ao tratamento com o inibidor de tirosina cinase lapatinib, e as mesmas quando em co-cultura com fibroblastos de pele normais tornam-se insensíveis aos danos do inibidor (Konecny et al., 2006). Além disso, apesar de alguns tipos celulares terem a capacidade de ser manter em meio basal, a maioria das células precisam de adição de outros suplementos para sobreviver, proliferar e diferenciar (van der Valk et al., 2010). Essa característica pode ser aplicada para a linhagem SKHep-1, onde a falta da suplementação de soro fetal bovino impediu que os fatores de crescimento estimulasse vias que levasse a proliferação. Essa característica foi observada nos experimentos de curva de crescimento e de formação de colônias (Figuras 10 e 14). No experimento de formação de colônias, observou-se que as células iniciais que conseguiram em um primeiro momento aderir, perderam sua aderência à placa e entraram em processo de morte, na ausência da suplementação de soro.

Um estudo demonstrou a dependência da densidade celular para a responsividade a fatores de crescimento. Fibroblastos humanos neonatais quando plaqueados em alta densidade em meio sem soro e tratados com fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) incorporam mais <sup>3</sup>H-Timidina, o

que representa maior taxa de proliferação celular. Outro dado encontrado pelos autores é que a cultura de fibroblastos em meio sem soro responde mais aos fatores de crescimento como EGF e PDGF quando é adicionado ao meio 0,5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (Betsholtz & Westermark, 1984). Assim, um fator que deve ser levado em conta é a necessidade de interação célula a célula para que as mesmas entrem em processo de duplicação e expansão clonal. Quando as células são plaqueadas para o experimento de *wound healing*, elas estão em confluência muito alta, o que facilita a proliferação e migração das mesmas. Já no plaqueamento para os experimentos de curva de crescimento e clonogênico, a confluência é mais baixa ou considerada ausente, como no ensaio clonogênico.

O ensaio de proliferação nos forneceu resultados inconclusivos, e outras técnicas mais sensíveis deverão ser empregadas para comprovar o resultado. Já o ensaio de formação de colônia demonstrou que não há a expansão clonal das células SKHep-1 após tratamento com os ligantes de EGFR somente. Assim, os ligantes de EGFR parecem não atuar como fatores de sobrevivência isolados nesta linhagem celular. Como os ligantes de EGFR não induzem proliferação celular, também podemos concluir que no experimento de *wound healing* o fechamento da ferida ocorre por estimulação da migração celular.

Ligantes de EGFR são funcionalmente distintos em modelos de sinalização parácrina e autócrina, e o acoplamento do EGFR a respostas biológicas podem ser especificados pela competição entre os ligantes de EGFR funcionalmente distintos. Existem muitas hipóteses que explicam essas distinções com base na afinidade de ligação desses agonistas e sua potência. Mas essas distinções podem ser independentes das diferenças na afinidade e podem então refletir a eficácia do ligante ou sua atividade intrínseca (Wilson et al., 2012). A sinalização do EGFR é variável em sua duração, via e reciclagem. Essa distinção pode refletir diretamente a capacidade de cada ligante em estimular a proliferação em diversos sítios.

# **6.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Neste trabalho, reportamos pela primeira vez o efeito dos ligantes de EGFR na translocação do receptor para o núcleo de linhagem celular de células hepáticas. Obtivemos que dentre os seis ligantes de EGFR analisados, EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$  e  $\beta$ -celulina induziram a translocação nuclear do EGFR, mesmo em baixas concentrações de estímulo. Já os ligantes epiregulina e anfiregulina não induziram a translocação nuclear do EGFR na linhagem celular SKHep-1.

Análise do valor de EC<sub>50</sub> dos ligantes que induziram a translocação nuclear resultou na seguinte relação indicativa de potência: HB-EGF > TGF- $\alpha$  >  $\beta$ -celulina > EGF. Assim sendo, HB-EGF foi o ligante com maior potência de translocação.

Por meio do nosso painel de resíduos de tirosina, serina e treonina fosforilados após estímulo com os ligantes, podemos observar que os ligantes EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$  e  $\beta$ -celulina, em geral, fosforilam mais sítios quando comparados aos ligantes epiregulina e anfiregulina, e também geram maior ativação das cinases ERK e AKT.

Também encontramos que os ligantes de EGFR são eficientes em induzir a cicatrização de “ferida” realizada em monocamada de células SKHep-1. Os quatro ligantes que induziram translocação nuclear do EGFR (EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$  e  $\beta$ -celulina) foram eficientes nessa função, mas não foi possível estratificar a relação de potência entre eles.

Por fim, obtivemos que os ligantes de EGFR não são eficientes em induzir a formação de colônias e a proliferação celular quando somente estes são suplementados no meio de cultivo, na ausência de soro fetal bovino.

Como perspectivas, temos em vista a realização de mutações sítio dirigidas em resíduos de tirosina que são candidatos como importantes para a translocação nuclear, além da identificação de proteínas adaptadoras importantes para essa função.



# **7.Referências**

- Abbott, B. D., Lin, T.-M., Rasmussen, N. T., Albrecht, R. M., Schmid, J. E., & Peterson, R. E. (2003). Lack of expression of EGF and TGF- $\alpha$  in the fetal mouse alters formation of prostatic epithelial buds and influences the response to TCDD. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *76*(2), 427–36. doi:10.1093/toxsci/kfg238
- Aquino, G., Pannone, G., Santoro, A., Liguori, G., Franco, R., Serpico, R., ... Di Domenico, M. (2012). pEGFR-Tyr 845 expression as prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Biology Therapy*, *13*(11), 967–977.
- Baba, I., Shirasawa, S., & Iwamoto, R. (2000). Involvement of Deregulated Epiregulin Expression in Tumorigenesis in Vivo through Activated Ki-Ras Signaling Pathway in Human Colon Cancer Cells. *Cancer Research*, *60*, 6886–6889.
- Bao, J., Alroy, I., Waterman, H., Schejter, E. D., Brodie, C., Gruenberg, J., & Yarden, Y. (2000). Threonine phosphorylation diverts internalized epidermal growth factor receptors from a degradative pathway to the recycling endosome. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(34), 26178–86. doi:10.1074/jbc.M002367200
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, *16*(5), 585–601. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
- Batzer, A., Rotin, D., Urena, J., Skolnik, E., & Schlessinger, J. (1994). Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(8), 5192–5201. Retrieved from <http://mcb.asm.org/content/14/8/5192.short>
- Berasain, C., Castillo, J., Perugorría, M. J., Prieto, J., & Avila, M. a. (2007). Amphiregulin: a new growth factor in hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*, *254*(1), 30–41. doi:10.1016/j.canlet.2007.01.015
- Besner, G., Higashiyama, S., & Klagsbrun, M. (1990). Isolation and characterization of a macrophage- derived heparin-binding growth factor. *Cell Regulation*, *1*, 811–819.
- Betsholtz, C., & Westermark, B. (1984). Growth factor-induced proliferation of human fibroblasts in serum-free culture depends on cell density and extracellular calcium concentration. *Journal of Cellular Physiology*, *118*, 203–210. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.1041180213/abstract>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248–254.



- Brown, G. L., Curtsinger, L., Brightwell, J. R., Ackerman, D. M., Tobin, G. R., Polk Jr, H. C., ... Schultz, G. S. (1986). Enhancement of Epidermal Regeneration by Biosynthetic Epidermal Growth factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 163(May), 1319–1324.
- Burwen, S. J., & Jones, A. L. (1987). The association of polypeptide hormones and growth factors with the nucleus of target cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 159–162.
- Campos, A. C. D. A. (2010). *Balsas lipídicas são necessárias para a translocação do Receptor do Fator de Crescimento Epidermal para o núcleo*. UFMG.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1655–7. doi:10.1126/science.296.5573.1655
- Cao, H., Lei, Z. M., Bian, L., & Rao, C. V. (1995). Functional nuclear epidermal growth factor receptors in human choriocarcinoma JEG-3 cells and normal human placenta. *Endocrinology*, 136(7), 3163–3172.
- Carpenter, G., & Cohen, S. (1990). Epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(May 15), 7709–7712.
- Catterton, W., Escobedo, M., Sexson, W., Gray, M., Sundell, H., & Stahlman, M. (1979). Effect of epidermal growth factor on lung maturation in fetal rabbits. *Pediatric Research*, 13(2), 104–108.
- Celikel, C., Eren, F., Gulluoglu, B., Bekiroglu, N., & Turhal, S. (2007). Relation of neuroendocrine cells to transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor expression in gastric adenocarcinomas: Prognostic implications. *Pathology & Oncology Research*, 13(3), 215–226. doi:10.1007/BF02893502
- Cha, D., O'Brian, P., O'Toole, E., Woodley, D. T., & Hudson, L. G. (1996). Enhanced modulation of keratinocyte motility by transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) relative to epidermal growth factor (EGF). *The Society for Investigative Dermatology*, 106(4), 590–597.
- Chang, C.-P., Lazar, C. S., Walsh, B. J., Komuro, M., Collawn, J. F., Kuhn, L. A., ... Gill, G. N. (1993). Ligand-induced internalization of the epidermal growth factor receptor is mediated by multiple endocytic codes analogous to the tyrosine motif found in constitutively internalized receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 268(26), 19312–19320. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/268/26/19312.short>
- Chattopadhyay, A., Vecchi, M., Ji, Q. -s., Mernaugh, R., & Carpenter, G. (1999). The Role of Individual SH2 Domains in Mediating Association of Phospholipase C- 1 with the Activated EGF Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26091–26097. doi:10.1074/jbc.274.37.26091

- Chen, P., Gupta, K., & Wells, A. (1994). Cell movement elicited by epidermal growth factor receptor requires kinase and autophosphorylation but is separable from mitogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 124(4), 547–555. Retrieved from <http://jcb.rupress.org/content/124/4/547.abstract>
- Chen, P., Xie, H., Sekar, M. C., Gupta, K., & Wells, A. (1994). Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement. *The Journal of Cell Biology*, 127(3), 847–857. Retrieved from <http://jcb.rupress.org/content/127/3/847.abstract>
- Cheng, H., Wang, L., Mollica, M., Re, A. T., Wu, S., & Zuo, L. (2014). Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer Letters*, 353(1), 1–7. doi:10.1016/j.canlet.2014.07.014
- Ciardiello, F., Kim, N., & Saeki, T. (1991). Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(September), 7792–7796. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/88/17/7792.short>
- Citri, A., & Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(7), 505–16. doi:10.1038/nrm1962
- CJ, X., & XF, Z. (2004). EGF family of growth factors: essential roles and functional redundancy in the nerve system. *Frontiers in Biosciences*, 9, 84–92.
- Coffey Jr, R. J., Derynck, R., Wilcox, J. N., Bringman, T. S., Goustin, A. S., Moses, H. L., & Pittelkow, M. R. (1987). Production and auto-induction of transforming growth factor- $\alpha$  in human keratinocytes. *Science*, 238, 817–820.
- Coffey, R. J., Romano, M., Polk, W. H., & Dempsey, P. J. (1992). Roles for Transforming Growth Factor- $\alpha$  in Gastric Physiology and Pathophysiology. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 65, 693–704.
- Cohen, S. (1962). Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal \*.
- Cohen, S., & Carpenter, G. (1975). Human Epidermal Growth Factor: Isolation and Chemical and Biological Properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(4), 1317–1321.
- Cohen, S., & Elliott, G. A. (1963). The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *The Journal of Investigative Dermatology*, 40, 1–5.

- Countaway, J. L., McQuilkin, P., Girones, N., & Davis, R. J. (1990). Multisite Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(6), 3407–3416.
- Countaways, J. L., Nairng, C., & Davis, J. T. (1992). Mechanism of desensitization of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(2), 1129–1140. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/267/2/1129.short>
- Coussens, L., Yang-feng, T. L., Liao, Y., Chen, E., Gray, A., Mcgrath, J., ... Ullrich, A. (1985). Tyrosine Kinase Receptor with Extensive Homology to EGF Receptor Shares Chromosomal Location with neu Oncogene. *Science*, 230, 1132–1139.
- Dahlhoff, M., Wolf, E., & Schneider, M. R. (2014). The ABC of BTC: structural properties and biological roles of betacellulin. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 28, 42–8. doi:10.1016/j.semcdb.2014.01.002
- De Angelis Campos, A. C., Rodrigues, M. A., de Andrade, C., de Goes, A. M., Nathanson, M. H., & Gomes, D. A. (2011). Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via clathrin-dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(2), 341–346. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.100.Epidermal
- De Larco, J. E., & Todaro, G. J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(8), 4001–4005. doi:10.1073/pnas.75.8.4001
- Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Fleming, T. F., Hazan, R., Ullrich, A., King, C. R., ... Aaronson, S. A. (1987). Overexpression of the Human EGF Receptor Confers an EGF-Dependent Transformed Phenotype to. *Cell*, 51, 1063–1070.
- Dittmann, K., Mayer, C., Birgit, F., Schaller, M., Raju, U., Luka, M., ... Rodemann, H. P. (2005). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 31182–31189. doi:10.1074/jbc.M506591200
- Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Kehlbach, R., & Rodemann, H. P. (2010). Nuclear EGFR shuttling induced by ionizing radiation is regulated by phosphorylation at residue Thr654. *Federation of European Biochemical Societies - FEBS Letters*, 584(18), 3878–3884. doi:10.1016/j.febslet.2010.08.005
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., ... Waterfield, M. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 307, 521–527. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v307/n5951/abs/307521a0.html>

- Dunbar, A. J., & Goddard, C. (2000). Structure-function and biological role of betacellulin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(8), 805–815. doi:10.1016/S1357-2725(00)00028-5
- Eckstein, N., Servan, K., Girard, L., Cai, D., von Jonquieres, G., Jaehde, U., ... Royer, H.-D. (2008). Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 739–750. doi:10.1074/jbc.M706287200
- Eden, E. R., Huang, F., Sorkin, A., & Futter, C. E. (2012). The role of EGF receptor ubiquitination in regulating its intracellular traffic. *Traffic*, 13(2), 329–37. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01305.x
- Fiske, W. H., Threadgill, D., & Coffey, R. J. (2009). ERBBs in the gastrointestinal tract: recent progress and new perspectives. *Experimental Cell Research*, 315(4), 583–601. doi:10.1016/j.yexcr.2008.10.043
- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & Bree, C. van. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319.
- Goldstein, N., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P., & Mendelsohn, J. (1995). Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clinical Cancer Research*, 1, 1311–1318. Retrieved from <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/1/11/1311.short>
- Gospodarowicz, D. (1981). Epidermal and Nerve Growth Factors in Mammalian Development. *Annual Review of Physiology*, 43(3), 251–263.
- Grøvdal, L. M., Stang, E., Sorkin, A., & Madshus, I. H. (2004). Direct interaction of Cbl with pTyr 1045 of the EGF receptor (EGFR) is required to sort the EGFR to lysosomes for degradation. *Experimental Cell Research*, 300(2), 388–395. doi:10.1016/j.yexcr.2004.07.003
- Gupta, R. A., & Dubois, R. N. (2001). COLORECTAL CANCER PREVENTION OF CYCLOOXYGENASE-2. *Nature Reviews. Cancer*, 1(October), 11–21.
- Haase, I., Evans, R., Pofahl, R., & Watt, F. M. (2003). Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 15), 3227–38. doi:10.1242/jcs.00610
- Hallberg, B., Rayter, S., & Downward, J. (1994). Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(6), 3913–3916. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/269/6/3913.short>

- Hanada, N., Lo, H.-W., Day, C.-P., Pan, Y., Nakajima, Y., & Hung, M.-C. (2006). Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Molecular Carcinogenesis*, 45(1), 10–7. doi:10.1002/mc.20147
- Hans, M., Michael W, H., Leroy E, H., & George J, T. (1984). Rat Transforming Growth Factor Type 1: Structure and Relation to Epidermal Growth Factor. *Science*, 223(4640), 1079–1082.
- Hardwicke, J., Schmaljohann, D., Boyce, D., & Thomas, D. (2008). Epidermal growth factor therapy and wound healing - past, present and future perspectives. *The Surgeon*, 6(3), 172–177. doi:10.1016/S1479-666X(08)80114-X
- Hashimotos, K., Higashiyamasfl, S., Asada, H., Hashimura, E., Kobayashi, T., Sudo, K., ... Taniguichi, N. (1994). Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor Is an Autocrine Growth Factor for Human Keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 20060–20066.
- Hassell, J. R. (1975). The Development of Rat Palatal Shelves in Vitro. *Developmental Biology*, 45, 90–102.
- Heisermann, G. J., & Gill, G. N. (1988). Epidermal growth factor receptor threonine and serine residues phosphorylated in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(26), 13152–13158. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/263/26/13152.short>
- Higashiyama, S., Abraham, J., & Miller, J. (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*, 251(12), 936–939. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/content/251/4996/936.short>
- Higashiyama, S., Abraham, J., Miller, J., & Klagsbrun, M. (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*, 251, 936–939. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/content/251/4996/936.short>
- Higashiyama, S., Iwamoto, R., Goishi, K., Raab, G., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., & Mekada, E. (1995). The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *The Journal of Cell Biology*, 128(5), 929–938. Retrieved from <http://jcb.rupress.org/content/128/5/929.abstract>
- Higashiyama, S., & View, M. (1993). Heparin-binding EGF-like Growth Factor Stimulation of Smooth Muscle Cell Migration: Dependence on Interactions with Cell Surface Heparan Sulfate. *The Journal of Cell Biology*, 122(4), 933–940.

- Higashiyamas, S., Lauq, K., Besners, G. E., Abraham, A. J., & Klagsbrun, M. (1992). Structure of Heparin-binding EGF-like Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(9), 6205–6212.
- Hoshino, M., Fukui, H., Ono, Y., Sekikawa, A., Ichikawa, K., Tomita, S., ... Fujimori, T. (2007). Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Pathobiology.*, 74(1), 15–21.
- Hsu, S., & Hung, M. (2007). Characterization of a Novel Tripartite Nuclear Localization Sequence in the EGFR Family. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10432–10440. doi:10.1074/jbc.M610014200
- Huang, F., Goh, L., & Sorkin, A. (2007). EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization. *Proceedings of the National ...*, 104(43), 16904–16909. doi:10.1073/pnas.0707416104
- Huang, W.-C., Chen, Y.-J., Li, L.-Y., Wei, Y.-L., Hsu, S.-C., Tsai, S.-L., ... Hung, M.-C. (2011). Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(23), 20558–68. doi:10.1074/jbc.M111.240796
- Huang, Y., & Chang, Y. (2011). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Phosphorylation, Signaling and Trafficking in Prostate Cancer. *Intech Journals*, 143–173. Retrieved from <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/24224.pdf>
- Hung, L.-Y., Tseng, J. T., Lee, Y.-C., Xia, W., Wang, Y.-N., Wu, M.-L., ... Chang, W.-C. (2008). 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*, 36(13), 4337–4351. doi:10.1093/nar/gkn417
- Hynes, N. E., & Lane, H. a. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews. Cancer*, 5(5), 341–54. doi:10.1038/nrc1609
- Imanishi, J., Kamiyama, K., Iguchi, I., Kita, M., Sotozono, C., & Kinoshita, S. (2000). Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19(1), 113–129. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946299000075>
- INCA. (2014). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA).
- Jaganathan, S., Yue, P., Paladino, D. C., Bogdanovic, J., Huo, Q., & Turkson, J. (2011). A functional nuclear epidermal growth factor receptor, SRC and

- Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells. *PloS One*, 6(5), e19605. doi:10.1371/journal.pone.0019605
- Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A., & Sorkin, A. (2003). Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 858–870. doi:10.1091/mbc.E02
- Joaquin, M., & Watson, R. J. (2003). Cell cycle regulation by the B-Myb transcription factor. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 60(11), 2389–401. doi:10.1007/s00018-003-3037-4
- Johnson, G. R., Kannans, B., Shoyabn, M., & Stromberg, K. (1993). Amphiregulin induces tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and p185erbB2. Evidence that amphiregulin acts exclusively through the epidermal growth factor receptor at the surface of human epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(4), 2924–2931.
- Johnson, G. R., Saeki, T., Gordon, A. W., Shoyab, M., Salomon, D. S., & Stromberg, K. (1992). Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. *The Journal of Cell ...*, 118(3), 741–751. Retrieved from <http://jcb.rupress.org/content/118/3/741.abstract>
- Johnson, G., & Vaillancourt, R. R. (1994). Sequential protein kinase reactions controlling and differentiation cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*, 6, 230–238.
- Jones, J. T., Akita, R. W., & Sliwkowski, M. X. (1999). Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Letters*, 447, 227–231.
- Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P. J., Ward, C. W., & Burgess, A. W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research*, 284, 31–53. doi:10.1016/S0014-4827(02)00098-8
- Kajikawa, K., Yasui, W., Sumiyoshi, H., Yoshida, K., Nakayama, H., Ayhan, A., ... Tahara, E. (1991). Expression of epidermal growth factor in human tissues. Immunohistochemical and biochemical analysis. *Virchows Archiv: The European Journal of Pathology*, 418(1), 27–32.
- Kannangai, R., Sahin, F., & Torbenson, M. S. (2006). EGFR is phosphorylated at Ty845 in hepatocellular carcinoma. *Modern Pathology*, 19, 1456–1461. doi:10.1038/modpathol.3800665
- Kim, H.-P., Yoon, Y.-K., Kim, J.-W., Han, S.-W., Hur, H.-S., Park, J., ... Kim, T.-Y. (2009). Lapatinib, a dual EGFR and HER2 tyrosine kinase inhibitor, downregulates thymidylate synthase by inhibiting the nuclear translocation of EGFR and HER2. *PloS One*, 4(6), e5933. doi:10.1371/journal.pone.0005933

- Kim, T., Lee, J., Song, S., & Choi, J. (2006). Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer. *British Journal of ...*, *94*(11), 1678–1682. doi:10.1038/sj.bjc.6603180
- Koivisto, L., Jiang, G., Häkkinen, L., Chan, B., & Larjava, H. (2006). HaCaT keratinocyte migration is dependent on epidermal growth factor receptor signaling and glycogen synthase kinase-3alpha. *Experimental Cell Research*, *312*(15), 2791–805. doi:10.1016/j.yexcr.2006.05.009
- Konecny, G. E., Pegram, M. D., Venkatesan, N., Finn, R., Yang, G., Rahmeh, M., ... Slamon, D. J. (2006). Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Research*, *66*(3), 1630–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1182
- Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescut, N. C., & Aaronson, S. A. (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: Evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(December), 9193–9197.
- Lauffenburger, D. a, & Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, *84*(3), 359–369. doi:10.1016/S0092-8674(00)81280-5
- Lax, I., Johnson, A., Howk, R., Sap, J., Bellot, F., Winkler, M., ... Givolit, D. (1988). Chicken Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor: cDNA Cloning, Expression in Mouse Cells, and Differential Binding of EGF and Transforming Growth Factor Alpha. *Molecular and Cellular Biology*, *8*(5), 1970–1978.
- Lee, D., Pearsall, R., Das, S., Dey, S. K., Godfrey, V. L., & Threadgill, D. W. (2004). Epiregulin is not essential for development of intestinal tumors but is required for protection from intestinal damage. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(20), 8907–8916. doi:10.1128/MCB.24.20.8907
- Lemmon, M. a, Schlessinger, J., & Ferguson, K. M. (2014). The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(4), a020768. doi:10.1101/cshperspect.a020768
- Li, C., Iida, M., Dunn, E., Ghia, A., & Wheeler, D. (2009). Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene*, *28*(43), 3801–3813. doi:10.1038/onc.2009.234
- Li, X., Huang, Y., Jiang, J., & Frank, S. J. (2008). ERK-dependent threonine phosphorylation of EGF receptor modulates receptor downregulation and signaling. *Cellular Signalling*, *20*(11), 2145–55. doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.006



- Lin, S., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., ... Hung, M. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature Cell Biology*, 3, 802–808.
- Lipponen, P., & Eskelinen, M. (1994). Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2 , p53) expression and long-term prognosis. *British Journal of Cancer*, 1125(January), 1120–1125.
- Lo, H., Cao, X., Zhu, H., & Ali-Osman, F. (2010). Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Molecular Cancer Research*, 8(2), 232–245. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0391.COX-2
- Lo, H., & Hung, M. (2006). Nuclear EGFR signalling network in cancers : linking EGFR pathway to cell cycle progression , nitric oxide pathway and patient survival. *British Journal of Cancer*, 94, 184–188. doi:10.1038/sj.bjc.6602941
- Lo, H.-W., Ali-Seyed, M., Wu, Y., Bartholomeusz, G., Hsu, S.-C., & Hung, M.-C. (2006). Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin  $\beta$ 1 and CRM1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(6), 1570–1583. doi:10.1002/jcb.20876
- Lo, H.-W., Hsu, S.-C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., ... Hung, M.-C. (2005). Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell*, 7(6), 575–89. doi:10.1016/j.ccr.2005.05.007
- Lo, H.-W., & Hung, M.-C. (2006). Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *British Journal of Cancer*, 94(2), 184–8. doi:10.1038/sj.bjc.6602941
- Lo, H.-W., & Hung, M.-C. (2006). Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *British Journal of Cancer*, 94(2), 184–8. doi:10.1038/sj.bjc.6602941
- Lo, H.-W., Xia, W., Wei, Y., Ali-Seyed, M., Huang, S.-F., & Hung, M.-C. (2005). Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Research*, 65(1), 338–348. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/1/338.short>
- Luttrell, D., Luttrell, L., & Parsons, S. (1988). Augmented mitogenic responsiveness to epidermal growth factor in murine fibroblasts that overexpress pp60c-src. *Molecular and Cellular Biology*, 8(1), 497–501. Retrieved from <http://mcb.asm.org/content/8/1/497.short>

- M, K., R, H., M, K., J, I., R, D., T, K., ... M, I. (2000). Auto-induction and growth stimulatory effect of betacellulin in human pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology*, 16(1), 37–41.
- Maa, M., Leu, T., McCarley, D., Schatzman, R., & Parsons, S. (1995). Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proceedings of the ...*, 92(July), 6981–6985. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/92/15/6981.short>
- Macdonald-Obermann, J. L., & Pike, L. J. (2014). Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(38), 26178–88. doi:10.1074/jbc.M114.586826
- MARIKOVSKY, M., BREUING, K., Liu, P. Y., ERIKSSON, E., HIGASHIYAMA, S., FARBER, P., ... KLAGSBRUN, M. (1993). Appearance of heparin-binding EGF-like growth factor in wound fluid as a response to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 3889–3893. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/90/9/3889.short>
- Marikovsky, M., Vogt, P., Eriksson, E., Rubin S, J., Taylor, W. G., Joachim, S., & Klagsbrun, M. (1996). Wound fluid-derived heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growth factor-I for Balb/MK keratinocyte proliferation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 106(4), 616–621.
- Marti, U., Burwen, S. J. O., & Jones, L. (1989). Biological Effects of Epidermal Growth Factor , with Emphasis on the Gastrointestinal Tract and Liver : An Update. *Hepatology*, 9(1), 126–138.
- Marti, U., Burwen, S. J. O., Wells, A., Barker, M. E., Huling, S., Feren, A. M., & Jones, L. (1991). Localization of Epidermal Growth Factor Receptor in Hepatocyte Nuclei. *Hepatology*, 13, 15–20.
- Marti, U., Ruchti, C., Kämpf, J., Thomas, G. a, Williams, E. D., Peter, H. J., ... Bürgi, U. (2001). Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 11(2), 137–45. doi:10.1089/105072501300042785
- Masaharu, S., Hiroko, T., Megume, K., Reiko, S., Koichi, I., Yuen, S., ... Hidenori, Y. (1996). Human betacellulin, a member of the EGF family dominantly expressed in pancreas and small intestine, is fully active in a monomeric form. *Growth Factors*, 13, 181–191.
- Massagué, J. (1990). Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(35), 21393–21396.

- Massagué, J., & Pandiella, a. (1993). Membrane-anchored growth factors. *Annual Review of Biochemistry*, 62, 515–41. doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.002503
- McClintock, J., & Ceresa, B. (2010). Transforming growth factor- $\alpha$  enhances corneal epithelial cell migration by promoting EGFR recycling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(7), 3455–61. doi:10.1167/iovs.09-4386
- Miettinen, P., Berger, J., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R., Werb, Z., & Derynck, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*, 376, 337–341.
- Miyagawa, J., Higashiyama, S., Kawata, S., Inui, Y., Tamura, S., Yamamoto, K., ... Taniguchi, N. (1995). Localization of Heparin-binding EGF-like Growth Factor in the Smooth Muscle Cells and Macrophages of Human Atherosclerotic Plaques. *The American Society for Clinical Investigation*, 95, 404–411. Retrieved from <http://academicdepartments.musc.edu/neuromodulation/epapers/horvathjcn99hypocretin.pdf>
- Naglich, J. G., Metherall, J. E., Russell, D. W., & Eidels, L. (1992). Expression Cloning of a Diphtheria Toxin Receptor: Identity with a Heparin-Binding EGF-like Growth Factor Precursor. *Cell*, 69, 1051–1061.
- Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T., & Chistopoulos, A. (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological Review*, 55(4), 597–606. doi:10.1124/pr.55.4.4.and
- Nimni, M. E. (1997). Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials*, 18(18), 1201–1225. doi:10.1016/S0142-9612(97)00050-1
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., ... Salomon, D. S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366(1), 2–16. doi:10.1016/j.gene.2005.10.018
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., ... Yokoyama, S. (2002). Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell*, 110(6), 775–787. doi:10.1016/S0092-8674(02)00963-7
- OMS. (2012). International Agency for Research on Cancer - World Health Organization.
- Ota, I., Higashiyama, S., Masui, T., Yane, K., Hosoi, H., & Matsuura, N. (2013). Heparin-binding EGF-like growth factor enhances the activity of invasion

and metastasis in thyroid cancer cells. *Oncology Reports*, 30(4), 1593–600. doi:10.3892/or.2013.2659

- Peoples, G. E., Blotinick, S., Takahashi, K., Freeman, M. R., Klagsbrun, M., & Eberlein, T. J. (1995). T lymphocytes that infiltrate tumors and atherosclerotic plaques produce heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor: A potential pathologic role. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 6547–6551. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/92/14/6547.short>
- Peplow, P. V., & Chatterjee, M. P. (2013). A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. *Cytokine*, 62(1), 1–21. doi:10.1016/j.cyto.2013.02.015
- Peterson, J. L., Phelps, E. D., Doll, M. a, Schaal, S., & Ceresa, B. P. (2014). The role of endogenous epidermal growth factor receptor ligands in mediating corneal epithelial homeostasis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(5), 2870–2880. doi:10.1167/iovs.13-12943
- Plowman, G. D., Culouscou, J., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., ... Shoyab, M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(March), 1746–1750.
- Prenzel, N., Fischer, O., Streit, S., Hart, S., & Ullrich, A. (2001). The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-Related Cancer*, 8, 11–31. Retrieved from <http://erc.endocrinology-journals.org/content/8/1/11.short>
- Psyrris, A., Egleston, B., Pectasides, E., Weinberger, P., Yu, Z., Kowalski, D., ... Burtness, B. (2008). Correlates and determinants of nuclear epidermal growth factor receptor content in an oropharyngeal cancer tissue microarray. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17(6), 1486–92. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-2684
- Psyrris, A., Yu, Z., Weinberger, P. M., Sasaki, C., Haffty, B., Camp, R., ... Burtness, B. A. (2005). Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clinical Cancer Research*, 11(16), 5856–62. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0420
- Raab, G., & Klagsbrun, M. (1997). Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1333, 179–199. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X97000243>
- Raab, G., Kover, K., Paria, B., Dey, S., Ezzell, R., & Klagsbrun, M. (1996). Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor.

*Development*, 122, 637–645. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/122/2/637.short>

- Raper, S. E., Burwen, S. J., Barker, M. E., & Jones, A. L. (1987). Translocation of Epidermal Growth Factor to the Hepatocyte Nucleus During Rat Liver Regeneration. *Gastroenterology*, 92, 1243–1250. doi:10.1016/S0016-5085(87)91084-5
- Real, F. X., Rettig, W. J., Chesa, P. G., Melamed, M. R., Old, L. J., & Mendelsohn, J. (1986). Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Human Cultured Cells and Tissues: Relationship to Cell Lineage and Stage of Differentiation Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Human Cultured Cells and Tissues: Relationship to Cell Lineage. *Cancer Research*, 46, 4726–4731.
- Révillion, F., Lhotellier, V., Hornez, L., Bonnetterre, J., & Peyrat, J.-P. (2008). ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis. *Annals of Oncology*, 19(1), 73–80. doi:10.1093/annonc/mdm431
- Riese, D. J., & Cullum, R. L. (2014). Epregrulin: roles in normal physiology and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 28, 49–56. doi:10.1016/j.semcdb.2014.03.005
- Roepstorff, K., Grandal, M. V., Henriksen, L., Knudsen, S. L. J., Lerdrup, M., Grøvdal, L., ... van Deurs, B. (2009). Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(8), 1115–27. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00943.x
- Roepstorff, K., Grøvdal, L., Grandal, M., Lerdrup, M., & van Deurs, B. (2008). Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(5), 563–578. doi:10.1007/s00418-008-0401-3
- Salomon, D., Brandt, R., Ciardiello, F., & Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, 19(94), 183–232. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Epidermal+growth+factor-related+peptides+and+their+receptors+in+human+malignancies#0>
- Sanders, J. M., Wampole, M. E., Thakur, M. L., & Wickstrom, E. (2013). Molecular determinants of epidermal growth factor binding: a molecular dynamics study. *PloS One*, 8(1), e54136. doi:10.1371/journal.pone.0054136
- Sandgren, E. P., Luetkeke, N. C., Palmiter, R. D., Brinster, R. L., & Lee, D. C. (1990). Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of

epithelial hyperplasia, pancreaticmetaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell*, 61(6), 1121–1135.

Sasada, R., Ono, Y., Taniyama, Y., Shing, Y., Folkman, J., & Igarashi, K. (1993). Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 190(3), 1173–1179. Retrieved from [http://journals.lww.com/jpgn/Abstract/1993/10000/Cloning\\_and\\_Expression\\_of\\_cDNA\\_Encoding\\_Human.25.aspx](http://journals.lww.com/jpgn/Abstract/1993/10000/Cloning_and_Expression_of_cDNA_Encoding_Human.25.aspx)

Schausberger, E., Eferl, R., Parzefall, W., Chabikovsky, M., Breit, P., Wagner, E., ... Grasl-Kraupp, B. (2003). Induction of DNA synthesis in primary mouse hepatocytes is associated with nuclear pro-transforming growth factor alpha and erbb-1 and is independent of c-jun. *Carcinogenesis*, 24(5), 835–841. doi:10.1093/carcin/bgg027

Schlessinger, J. (2014). Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(3). doi:10.1101/cshperspect.a008912

Schlondorff, J., & Blobel, C. P. (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *Journal of Cell Science*, 3617, 3603–3617. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/112/21/3603.short>

Schulze, A., Lehmann, K., Jefferies, H. B., McMahon, M., & Downward, J. (2001). Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes & Development*, 15, 981–994. doi:10.1101/gad.191101.The

SHIGEISHI, H., HIGASHIKAWA, K., HIRAOKA, M., FUJIMOTO, S., MITANI, Y., OHTA, K., ... KAMATA, N. (2008). Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas. *Oncology ...*, 19, 1557–1564. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/sp/or/2008/00000019/00000006/art00028>

Shing, Y., Christofori, G., Hanahan, D., Ono, Y., Sasada, R., Igarashu, K., & Folkman, J. (1993). Betacellulin: A Mitogen From Pancreatic B Cell Tumors. *Science*, 259(March), 1604–1607.

SHOYAB, M., MCDONALD, V. L., BRADLEY, J. G., & TODARO, G. J. (1988). Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(September), 6528–6532. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/85/17/6528.short>

- Shoyab, M., Plowman, G. D., McDonald, V. L., Bradley, J. G., & Todaro, G. J. (1988). Structure and Function of Human Amphiregulin: A Member of the Epidermal Growth Factor Family. *Science*, *243*, 1074–1076.
- Sibilia, M., & Wagner, E. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*, *269*(1992), 234–238. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/content/269/5221/234.short>
- Singh, B., & Coffey, R. J. (2014). From wavy hair to naked proteins: the role of transforming growth factor alpha in health and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *28*, 12–21. doi:10.1016/j.semcdb.2014.03.003
- Sorkin, A., Helin, K., Waters, C. M., Carpenter, G., & Beguinot, L. (1992). Multiple autophosphorylation sites of the epidermal growth factor receptor are essential for receptor kinase activity and internalization. Contrasting significance of. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(12), 8672–8678. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/267/12/8672.short>
- Sorkin, A., Waters, C. M., Overholser, K. A., & Carpenter, G. (1991). Multiple autophosphorylation site mutations of the epidermal growth factor receptor. Analysis of kinase activity and endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(13), 8355–8362. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/266/13/8355.short>
- Starkey, R. H., Cohen, S., & Orth, D. N. (1974). Epidermal Growth Factor: Identification of a New Hormone in Human Urine. *Science*, *189*(21), 800–802.
- Stoscheck, C. M., & King, L. E. (1986). Role of Epidermal Growth Factor in Carcinogenesis. *Cancer Science*, *46*, 1030–1037.
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-rokni, M., Rong, Z., Du, J., ... Todd, R. G. (2013). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, *487*(7408), 500–504. doi:10.1038/nature11183.Tumor
- Sun, L., & Carpenter, G. (1998). Epidermal growth factor activation of NF- $\kappa$ B is mediated through I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and intracellular free calcium. *Oncogene*, *16*(November 1997), 2095–2102.
- Takemura, T., Kondo, S., Homma, T., Sakai, M., & Harris, R. C. (1997). The Membrane-bound Form of Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor Promotes Survival of Cultured Renal Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(49), 31036–31042. doi:10.1074/jbc.272.49.31036
- Takeuchi, S., & Yano, S. (2014). Clinical significance of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: Sensitivity and resistance. *Respiratory Investigation*, *52*(6), 348–356. doi:10.1016/j.resinv.2014.10.002

- Temin, H. M. (1966). Studies on carcinogenesis by avian sarcoma viruses. III: The differential effect of serum and polyanions on multiplication of uninfected and converted cells. *Journal of the National Cancer Institute*, *37*, 167–175.
- Temin, H. M. (1967). Studies on carcinogenesis by avian sarcoma viruses. III: The differential effect of serum and polyanions on multiplication of uninfected and converted cells. *Journal of Cellular Physiology*, *69*, 377–384.
- Todoya, H., Komurasaki, T., Uchida, D., Takayama, Y., Isobe, T., Okuyama, T., & Hanada, K. (1995). Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(13), 7495–7500.
- Tong, J., Taylor, P., Peterman, S. M., Prakash, A., & Moran, M. F. (2009). Epidermal growth factor receptor phosphorylation sites Ser991 and Tyr998 are implicated in the regulation of receptor endocytosis and phosphorylations at Ser1039 and Thr1041. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *8*(9), 2131–44. doi:10.1074/mcp.M900148-MCP200
- Toulany, M., Baumann, M., & Rodemann, H. P. (2007). Stimulated PI3K-AKT signaling mediated through ligand or radiation-induced EGFR depends indirectly, but not directly, on constitutive K-Ras activity. *Molecular Cancer Research*, *5*(8), 863–872. doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0297
- TOYODA, H., KOMURASAKI, T., UCHIDA, D., & MORIMOTO, S. (1997). Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *The Biochemical Journal*, *326*, 69–75. Retrieved from <http://www.biochemj.org/bj/326/bj3260069.htm>
- Troyer, K. L., Luetkeke, N. C., Saxon, M. L., Qiu, T. H., Xian, C. J., & Lee, D. C. (2001). Growth Retardation, Duodenal Lesions, and Aberrant Ileum Architecture in Triple Null Mice Lacking EGF, Amphiregulin, and TGF- $\alpha$ . *Gastroenterology*, *121*(1), 68–78. doi:10.1053/gast.2001.25478
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J., Dull, T., Gray, A., TAM, A., ... Schlessinger, J. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, *309*, 418–425.
- Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L. E., ... Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, *24*(4), 1053–63. doi:10.1016/j.tiv.2010.03.016
- Vivacqua, A., Lappano, R., De Marco, P., Sisci, D., Aquila, S., De Amicis, F., ... Maggiolini, M. (2009). G protein-coupled receptor 30 expression is up-



- regulated by EGF and TGF alpha in estrogen receptor alpha-positive cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 23(11), 1815–1826. doi:10.1210/me.2009-0120
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 2(7), 489–501. doi:10.1038/nrc839
- Voldborg, B. R., Damstrup, L., & Poulsen, H. S. (1997). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology*, (Figure 1), 1197–1206.
- Wang, F., Liu, R., Lee, S. W., Sloss, C. M., Couget, J., & Cusack, J. C. (2007). Heparin-binding EGF-like growth factor is an early response gene to chemotherapy and contributes to chemotherapy resistance. *Oncogene*, 26(14), 2006–2016. doi:10.1038/sj.onc.1209999
- Wang, F., Wang, S., Wang, Z., Duan, J., An, T., Zhao, J., ... Wang, J. (2012). Phosphorylated EGFR expression may predict outcome of EGFR-TKIs therapy for the advanced NSCLC patients with wild-type EGFR. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31(1), 1–10. doi:10.1186/1756-9966-31-65
- Wang, S.-C., & Hung, M.-C. (2009). Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors. *Clinical Cancer Research*, 15(21), 6484–6489. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2813
- Wang, Y.-N., Yamaguchi, H., Huo, L., Du, Y., Lee, H.-J., Lee, H.-H., ... Hung, M.-C. (2010). The translocon Sec61beta localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(49), 38720–9. doi:10.1074/jbc.M110.158659
- Watanabe, T., Shintani, A., Nakata, M., Shing, Y., Folkman, J., Igarashi, K., & Sasada, R. (1994). Recombinant Human Betacellulin: Molecular structure, biological activities, and receptor interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 9966–9973.
- Waterman, H., Sabanai, I., Geiger, B., & Yarden, Y. (1998). Alternative Intracellular Routing of ErbB Receptors May Determine Signaling Potency. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13819–13827. doi:10.1074/jbc.273.22.13819
- Wells, A. (1999). EGF receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(6), 637–643. doi:10.1016/S1357-2725(99)00015-1
- Wheeler, D., Huang, S., Kruser, T., Nechrebecki, M., Armstrong, S. B., Gondi, V., ... Harati, P. (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab:

- role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*, 27(28), 3944–3956. doi:10.1038/onc.2008.19.MECHANISMS
- Wheeler, D. L., Iida, M., Kruser, T. J., Nechrebecki, M. M., Dunn, E. F., Eric, A., ... Harari, P. M. (2009). Epidermal growth factor receptor cooperates with Src family kinases in acquired resistance to cetuximab. *Cancer Biology Teraphy*, 8(8), 696–703.
- Wilson, K. J., Gilmore, J. L., Foley, J., Lemmon, M. A., & Riese, D. J. (2009). Functional Selectivity of EGF Family Peptide Growth Factors: Implications for Cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 122(1), 1–8. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.11.008.Functional
- Wilson, K. J., Mill, C., Lambert, S., Buchman, J., Wilson, T. R., Hernandez-Gordillo, V., ... Riese, D. J. (2012). EGFR ligands exhibit functional differences in models of paracrine and autocrine signaling. *Growth Factors*, 30(2), 1–10. doi:10.3109/08977194.2011.649918
- Xia, W., Wei, Y., Du, Y., Liu, J., Chang, B., Yu, Y., ... Hung, M. (2009). Nuclear Expression of Epidermal Growth Factor Receptor is a Novel Prognostic Value in Patients with Ovarian Cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 48(7), 610–617. doi:10.1002/mc.20504.Nuclear
- Xu, K.-P., & Yu, F.-S. X. (2007). Cross Talk between c-Met e epidermal Growth Factor Receptor during Retinal Pigment Epithelial Wound Healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(5), 2242–2248.
- Xu, W., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M., & Charles, I. G. (2002). The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research*, 12(5-6), 311–20. doi:10.1038/sj.cr.7290133
- Xu, Y., Shao, Y., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. (2009). Ultraviolet Irradiation-Induces Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Nuclear Translocation in Human Keratinocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(5), 873–880. doi:10.1002/jcb.22195.Ultraviolet
- Yamauchia, T., Adachia, S., Yasudaa, I., Nakashimaa, M., Kawaguchia, J., Nishiib, Y., ... Moriwakia, H. (2001). UVC radiation induces downregulation of EGF receptor via phosphorylation at serine 1046/1047 in human pancreatic cancer cells. *Radiation Research*, 176(5), 564–574.
- Yu, Y., Chou, R., Wu, C.-H., Wang, Y., Chang, W., Tseng, Y., ... Hung, M.-C. (2012). Nuclear EGFR suppresses ribonuclease activity of polynucleotide phosphorylase through DNAPK-mediated phosphorylation at serine 776. *Journal of Biological ...*, 287(37), 31015–26. doi:10.1074/jbc.M112.358077
- Zhu, Z., Kleeff, J., Friess, H., Wang, L., Zimmermann, a, Yarden, Y., ... Korc, M. (2000). Epregrulin is Up-regulated in pancreatic cancer and stimulates

pancreatic cancer cell growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(3), 1019–24. doi:10.1006/bbrc.2000.3033