

CAMILA LAUAND

**Avaliação da proliferação e migração celular mediadas pela
ativação do EGFR em linhagens celulares de câncer de
pulmão cultivadas como monocamadas e esferoides**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

CAMILA LAUAND

**Avaliação da proliferação e migração celular mediadas pela
ativação do EGFR em linhagens celulares de câncer de
pulmão cultivadas como monocamadas e esferoides**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Lauand, Camila.

Avaliação da proliferação e migração celular mediadas pela ativação do EGFR em linhagens celulares de câncer de pulmão cultivadas como monocamadas e esferoides / Camila Lauand. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia da célula tumoral.

Versão do título para o inglês: Evaluation of cell proliferation and migration mediated by EGFR activation in lung cancer cell lines grown as monolayer and spheroids.

1. EGFR 2. Cancer de pulmão 3. EGF 4. Migração celular 5. Esferoides 6. Inibidor de tirosina quinase I. Santelli, Profa. Dra. Gláucia Maria Machado II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB080/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Camila Lauand.

Título da Tese: Avaliação da proliferação e migração celular mediadas pela ativação do EGFR em linhagens celulares de câncer de pulmão cultivadas como monocamadas e esferoides.

Orientador(a): Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

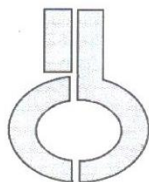
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **389/10** referente ao projeto intitulado: “*Expressão e localização celular de EGFR em células não pequenas de câncer de pulmão humano: seu papel na proliferação e morte celular*” sob a responsabilidade de **Camila Lauand**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 21 de junho de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Ao meu amado marido João Francisco, à minha
querida avó Claudeth e ao meu tio e pai Júlio Miguel.

AGRADECIMENTOS

Estou feliz! Foi uma caminhada muito grande para chegar até chegar aqui! Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me dado forças para chegar até essa etapa da minha vida!!!

À minha mãe, que me ensinou valores importantes para a condução da minha vida e mostrou que estudar é muito importante. Gostaria que ela se orgulhasse de mim...

À minha avó e mãe, Claudeth, que cuidou de mim a vida toda e sempre esteve ao meu lado quando precisei! Vó, a senhora foi a responsável por tornar tudo isso possível!

Ao meu tio Miguel por ter cuidado de mim e por toda a ajuda no financiamento dos meus estudos. Escola, curso de inglês, cursinho e ajuda financeira em toda a minha faculdade... Obrigada! Jamais teria conseguido sem você! Você é o melhor PAI do mundo.

Gostaria de agradecer todos os meus tios pela ajuda em toda a minha vida e pelo amor, essencial para o meu desenvolvimento. Amo muito todos vocês! Ao tio Felipe pelas longas conversas e conselhos, à tia Ana pelo companheirismo de sempre, à tia Caté pela doçura, à tia Luiza pelos passeios maravilhosos, ao tio Rogério e tio João pelas risadas e por fazerem minhas tias felizes e à Miriam, minha querida tia que tanto me ajudou nas épocas de estresse da vida! Obrigada mesmo... Amo muito cada um de você, tios amados...

Ao meu irmão Mattheus, a Rosane, Ana Beatriz e Gabriel, por todo o amor, carinho e amizade! Aos meus primos Gabriel, Rafael e Bruninho por todo o amor e companheirismo.

Ao meu marido, João Francisco (Kiko), por todo o amor e companheirismo em todas as etapas da minha vida! Obrigada pela paciência que sempre teve comigo... Você fez parte de todas as conquistas da minha vida! Eu te amo!

À família Rizzo pelo amor e risadas intermináveis! Maria de Fátima, João Reinaldo, Nathália, Daniel, Felipe, Léo, Michel, Luana, Mel e Leandro...

A todos os meus queridos amigos da faculdade que me acompanharam nessa trajetória: Alex, Tintin, Dolly, Gi, Tomás, Thais, Marcela e Quel. Obrigada Tomás pela revisão da tese!!!

À minha querida amiga Luana, minha metade, por sempre me ouvir e por ser essa amiga tão dedicada. Ao Colostro, meu $\frac{1}{4}$, por sempre estar disposto a me ajudar! Adoro vocês dois!

À minhas amigas da época de escola, em especial Fabiana e Vivian, e à minha amiga de infância Priscila (obrigada pela descoberta no erro do título Pri!), que estiveram comigo durante todo o tempo e entenderam minha ausência...

Ao Gustavo Burin Ferreira (Ari) pela ajuda na análise estatística do trabalho.

À minha amada orientadora, Dra. Gláucia Maria Machado Santelli, por ter confiado em mim e ter me dado a oportunidade de trabalhar nesse lindo laboratório. Aprendi muito com você chefe! Vou sentir muita saudade! Obrigada por todos os ensinamentos... Ganhei mais uma família, a família BIOCEM!

À minha querida amiga Amanda pelas diversões e estripulias no laboratório e por ser essa pessoa iluminada que só planta o bem.

À minha querida amiga Marina por todo o “olho-juntisse”, pelas risadas e pelo companheirismo...

À Raquel pelos abraços de urso! Abraços doloridos, mas muito gostosos...

Ao Jonatão por sempre ser tão engraçado, cordial e por toda a ajuda de sempre!

À Michele por ser sempre tão prestativa e carinhosa.

Ao Adam por ter me ensinado um pouco mais sobre a vida...

À Peruana Nati pelas refeições peruanas deliciosas.

À Vivian Zague pela sua doçura, experiência de vida e ajuda estatística...

Ao querido “amaleque” Evandro, meu colaborador de sempre, desde a iniciação científica! Obrigada pelos seus ensinamentos e pela tranquilidade que você emana! Vou sentir saudades de trabalhar com você.

À Bia e à Paula por toda a ajuda nos experimentos, companheirismo e risadas!

Ao Marcel por toda a ajuda de sempre... Você é muito prestativo!

À Marisa Ionta pela sua inteligência e ajuda no laboratório.

Ao Fábio pelas risadas e por me receber sempre tão bem em seu laboratório.

À Bianca, companheira da fase final do meu doutorado. Foi muito divertido trabalhar com você!

À Marlene, por todo o carinho e cuidado! Adoro você Marleninha!

À Anali, Maria, Stephanie, Jorge, Bruna, Juliana e Marcelo pelo companheirismo no laboratório.

Ao Roberto Cabado pelas dicas de Photoshop, pelas longas conversas no confocal, pelas lindas imagens de imunofluorescência, pela minha retrospectiva do casamento que ficou demais e pela capa da minha tese!

A todos que passaram pelo BIOCEM: Marisinha, Vivi, Stefania, Beatriz, Vanessa, Mingau, Ricardo, Marisa Rangel, Ciça, Dona Nancy... Espero não ter esquecido ninguém.

A todos os meus professores por terem me estimulado para o mundo maravilhoso do estudo!

Ao Colégio Giordano Bruno por ter me proporcionado momentos maravilhosos da minha vida. Descobri que queria ser professora nessa escola! Sou imensamente agradecida por tudo o que fizeram por mim. Gostaria de agradecer principalmente ao Nivaldo, Madeline, Lidiane, Andreia, Luciana e Laura.

Ao Colégio Dante Alighieri pela ajuda na etapa final do meu doutorado! Obrigada pela compreensão e ajuda de todos os meus colegas, em especial: Carol, Rita, Fulvia, Miriam, Regina, Fernando, Peterson, Guilherme, Mara, Geisly, Diogo e Sandra.

A Annie, minha gatinha e filha felina, pela companhia e carinho durante a escrita da minha tese.

A todos que estiveram direta ou indiretamente comigo nesta trajetória.

Aos funcionários do ICB, secretaria e biblioteca.

À FAPESP, a CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

“Toda a nossa ciência comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

(Albert Einstein)

RESUMO

LAUAND, C. **Avaliação da proliferação e migração celular mediadas pela ativação do EGFR em linhagens celulares de câncer de pulmão cultivadas como monocamadas e esferoides.** 2015. 157 f. Doutorado (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As células de câncer de pulmão frequentemente apresentam mutação e/ou amplificação no gene ErbB1. O EGFR, codificado pelo gene ErbB1, está superexpresso em células não pequenas de câncer de pulmão e essa superexpressão tem sido associada com maior agressividade da doença e baixa resposta a terapias. Este estudo teve como foco comparar os efeitos da ativação e inibição do EGFR em duas linhagens de células não pequenas de câncer de pulmão, A549 e HK2, com diferentes números de cópias do gene ErbB1, cultivadas em monocamada ou em cultura 3D. A cultura 3D foi obtida a partir de células cultivadas em placas não aderentes para a obtenção de esferoides. Utilizou-se meio de cultura sem elementos de matriz extracelular e as placas foram submetidas a rotação (20 rpm – rotação alternada para a direita e esquerda), a 37 °C por 14 dias. As células A549 e HK2 apresentaram, respectivamente, 3 e 6 cópias do gene ErbB1 por núcleo, em média, embora a expressão de EGFR seja menor nas células HK2 comparando com as A549. O nível de expressão de EGFR na cultura 3D foi similar ao obtido na monocamada e o nível de p-EGFR foi detectado nos esferoides mesmo sem estímulo com EGF. A ativação de EGFR por EGF ou inibição por AG1478 não promoveu mudanças na proliferação celular comparando-se com os grupos controle, na cultura em monocamada e nos esferoides. Entretanto, as células cultivadas em monocamada, estimuladas com EGF, apresentaram redução de adesão às células vizinhas, modificações na distribuição dos microfilamentos de actina acompanhando a morfologia fusiforme e presença de protrusões citoplasmáticas. O ensaio de ferida mostrou que as células fecharam a ferida mais rapidamente quando tratadas com EGF. A microscopia em tempo real mostrou que o estímulo com EGF aumentou a velocidade da migração das células. A migração das células dos esferoides foi investigada pelo ensaio de migração de esferoide. UO126 e LY294002 foram adicionados para inibir, respectivamente, as vias ERK e Akt tanto no modelo 3D como na monocamada. As células A549 estimuladas com EGF, cultivada em monocamada, não apresentaram envolvimento das vias de sinalização de ERK e Akt na migração celular, mas quando essas células foram cultivadas em cultura 3D, encontrou-se o envolvimento das duas vias, Akt e ERK. A linhagem A549 apresentou sinalização diferente para a migração celular nas diferentes formas de cultivo. Já a linhagem HK2, quando cultivada tanto em monocamada como na cultura 3D, apresentou o envolvimento da via de sinalização mediada por Akt para promover a migração celular após estímulo com EGF. Os dados em conjunto mostram que o EGF não promoveu a proliferação celular, mas induziu a migração das células cultivadas em monocamada e nos esferoides, com o envolvimento das vias de ERK e Akt.

Palavras-chave: Receptor do fator de crescimento epidérmico. Câncer de pulmão. Fator de crescimento epidérmico. Inibidor de tirosina quinase. Esferoides. Migração celular.

ABSTRACT

LAUAND, C. **Evaluation of cell proliferation and migration mediated by EGFR activation in lung cancer cell lines grown as monolayers and spheroids.** 2015. 157 p. Ph D. Thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Lung cancer commonly exhibits ErbB1 gene mutation and amplification. ErbB1 encodes EGFR, which is highly expressed in non-small-cell lung cancer (NSCLC) and has been associated with more aggressive disease and low response to therapy. The present study aimed to compare the effects of EGFR activation or inhibition, by EGF and AG1478, respectively, on two non-small cell lung cancer cell lines, A549 and HK2, with different ErbB1 copy number in 2D and 3D culture. 3D cultures were obtained by using cell suspensions in medium without extracellular matrix elements to spheroid formation. The culture was submitted to rotation (20 rpm – alternating clockwise and anticlockwise directions) in non-adherent dishes at 37 °C for 14 days. A549 and HK2 cells presented, respectively, 3 and 6 ErbB1 gene copies per nucleus, although EGFR expression was lower in HK2 than in A549 cells. EGFR levels in 3D cultures were similar to those observed in 2D and p-EGFR was detected in spheroids (A549/HK2) without EGF stimulus. EGFR activation or inhibition did not promote changes in cell proliferation compared to control groups in 2D culture and in spheroids. However, EGF stimulated cells exhibited changes in actin microfilaments and led to increased cell migration. Wound-healing assay showed that A549 and HK2 cells filled the wound faster after EGF exposure. We demonstrated by time-lapse microscopy that EGF increased cell migration velocity in these cells. To investigate cell migration in spheroids we performed sphere migration assay: spheroids were transferred individually to 24-well plates, treated with EGF or AG1478 and allowed to migrate; the diameter of the cell spreading was measured. UO126 and LY294002 were added to inhibit, respectively, ERK and Akt pathways in 2D and 3D cultures. A549 cells grown in monolayer did not show involvement of ERK and Akt signaling pathways in cell migration, but when these cells were cultured in spheroids, ERK and Akt pathways promoted cell migration. HK2 cells cultured in 3D and monolayer had the involvement of the Akt signaling pathway to promote cell migration after EGF stimulation. We could conclude that EGF did not induce cell proliferation but promoted cell migration in cells growing in 2D and 3D model. The migration of these NSCLC cells induced by EGF was mediated by Erk and Akt pathways. These results also provide new insights to culture NSCLC in a 3D model.

Keywords: Epidermal growth factor receptor. Lung cancer. Epidermal growth factor. Tyrosine kinase inhibitor. Spheroid. Cell migration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidência do câncer de pulmão no mundo padronizada pela idade e gênero.....	21
Figura 2 - Distribuição proporcional por gênero dos dez tipos de câncer mais frequentes no Brasil, estimados para 2014.....	22
Figura 3 - Regiões da proteína EGFR.....	25
Figura 4 - A região extracelular do EGFR possui 4 domínios.....	26
Figura 5 - Cascata de sinalização citoplasmática mediada pela ativação do EGFR.....	27
Figura 6 - Transição epitélio mesenquimal (TEM) e a modulação pelo EGF.....	31
Figura 7 - Método utilizado para a cultura dos esferoides por 14 dias e troca de meio a cada 48 horas.....	38
Figura 8 - Método de migração de esferoide (Spheroid migration assay).....	51
Figura 9 - Morfologia e crescimento das células não pequenas de câncer de pulmão, A549 e HK2.....	56
Figura 10 - Quantificação do número de cópias do gene ErbB1 nas linhagens A549 e HK2.....	58
Figura 11 - Localização celular, expressão e níveis de RNAm de EGFR nas células A549 e HK2.....	59
Figura 12 - Detecção da distribuição celular do EGFR nas linhagens A549 e HK2 após estímulo com EGF.....	61
Figura 13 - Distribuição do EGFR em vesículas do Complexo de Golgi após estímulo com EGF.....	62
Figura 14 - Localização e expressão de p-EGFR nas linhagens A549 e HK2.....	63
Figura 15 - Determinação do número de células após estímulo com EGF.....	67
Figura 16 - Determinação do número de células após estímulo com EGF em meio contendo 10%SFB.....	68
Figura 17 - Quantificação das metáfases após estímulo com EGF.....	70
Figura 18 - Teste de viabilidade por citometria após tratamento com AG1478.....	72

Figura 19 - Inibição da fosforilação do EGFR por AG1478.....	73
Figura 20 - Determinação do número de células depois da inibição por AG1478.....	74
Figura 21 - Avaliação dos efeitos do estímulo com EGF (100 ng/ml) na morfologia celular.....	76
Figura 22 - Ensaio de ferida evidenciando a migração celular induzida pelo EGF.....	78
Figura 23 - Gráficos mostrando a frequência de células que recuperaram a área das feridas após 24 e 48 horas de exposição ao EGF ou AG1478.....	79
Figura 24 - Distância total percorrida pelas células A549 e HK2 com diferentes tratamentos.....	81
Figura 25 – Velocidade das células após estímulo com EGF ou inibição com AG1478.....	82
Figura 26 - Detecção da expressão de vimentina, citoqueratina-18 e E-caderina por <i>Western blotting</i>	83
Figura 27 - Detecção da marcação de E-caderina por meio de imunofluorescência.....	84
Figura 28 - Quantificação dos níveis de expressão do RNAm para vimentina, citoqueratina-18, E-caderina e N-caderina por PCR quantitativo em tempo real.....	85
Figura 29 - Formação de aglomerados espontâneos de células mantidas sem agitação em placa não aderente.....	86
Figura 30 - Formação de aglomerados espontâneos de células em suspensão após cultivo em placa não aderente sob rotação de 10rpm.....	87
Figura 31 - Agregados celulares formados após 48 horas de cultivo das linhagens A549 e HK2 em placa não aderente sob rotação de 20 rpm.....	88
Figura 32 - Esferoides formados pelas linhagens A549 e HK2 após 48 horas, 7 e 14 dias de cultura sob rotação de 20 rpm.....	89
Figura 33 - Esferoides formados pelas linhagens A549 e HK2 após 7 e 14 dias em cultura.....	91
Figura 34 - Morfologia dos esferoides formados a partir de células das linhagens A549 e HK2 após 7 dias de cultivo.....	92
Figura 35 - Morfologia dos esferoides formados a partir de células das linhagens A549 e HK2 após 14 dias de cultivo.....	93
Figura 36 - Cortes histológicos dos esferoides formados após 14 dias de cultura pelas linhagens A549 e HK2, corados com hematoxilina e eosina.....	94

Figura 37 - Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão dos esferoides formados pelas linhagens A549 e HK2 após 14 dias de cultivo.....	96
Figura 38 - Curva de crescimento das células dos esferoides formados pelas células A549 e HK2, cultivados por 14 dias.....	98
Figura 39 - A frequência das células dos esferoides de ambas as linhagens foi maior na fase G1 do ciclo celular.....	99
Figura 40 - Análise do ciclo celular das células A549 e HK2 cultivadas em monocamada (2D).....	100
Figura 41 - Histogramas representativos da distribuição das fases do ciclo celular nas células A549 e HK2.....	101
Figura 42 - Exemplo da medição da área uma secção mediana dos esferoides formados pelas células das linhagens A549 e HK2.....	102
Figura 43 - Histogramas mostrando a distribuição da área dos esferoides após 7 e 14 dias em cultura.....	103
Figura 44 - Detecção da expressão de EGFR, p-EGFR, E-caderina pela técnica de <i>Western blotting</i> nas células da linhagem A549 e HK2 cultivadas em monocamada (2D) e na cultura 3D (esferoides)	105
Figura 45 - Níveis de RNA mensageiro para as proteínas EGFR e E-caderina pelas células A549 e HK2 cultivadas em monocamadas (2D) e em esferoides (3D).....	107
Figura 46 - Detecção de p-EGFR e EGFR nos esferoides das linhagens A549 e HK2 após estímulo com EGF e inibição com AG1478 por <i>Western blotting</i>	109
Figura 47 - Gráficos mostrando a frequência de células em fase S nos esferoides.....	110
Figura 48 - Histogramas mostrando que o EGF e o AG1478 não interferiram nas fases do ciclo celular das células dos esferoides das linhagens A549 e HK2.....	112
Figura 49 - Detecção dos níveis de expressão de p-ERK e p-Akt pelas células A549 e HK2 cultivadas em monocamada, utilizando a técnica <i>Western blotting</i>	114
Figura 50 - Detecção dos níveis de expressão de p-ERK e p-Akt pelos esferoides das linhagens A549 e HK2, utilizando a técnica <i>Western blotting</i>	115
Figura 51 - Alteração da morfologia dos esferoides da linhagem A549 causada pelo estímulo com EGF.....	116
Figura 52 - Detecção de E-caderina pela técnica de <i>Western blotting</i> nos esferoides estimulados com EGF ou inibidos com AG1478.....	117

Figura 53 - Inibição de p-ERK e de p-Akt nas linhagens A549 e HK2, cultivadas em monocamada.....	119
Figura 54 - Ensaio de ferida com as linhagens A549 e HK2 evidenciando a migração celular estimulada pelo EGF e o envolvimento de p-ERK e p-Akt nesse processo.....	121
Figura 55 - Gráficos mostrando a frequência de células que recuperaram a área das feridas após 24 e 48 horas de exposição ao EGF e ao inibidor de ERK (U0126) e de Akt (LY294002).....	122
Figura 56 - O método de migração de esferoide foi utilizado para analisar a migração das células dos esferoides formados pelas linhagens A549 e HK2.....	123
Figura 57 - Os gráficos mostram a distância percorrida pelas células a partir dos esferoides.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos experimentos de imunofluorescência.....	43
Tabela 2 - Anticorpos utilizados nos experimentos de <i>Western blotting</i>	46
Tabela 3 - Análise do ciclo celular das linhagens A549 e HK2 após estímulo com EGF (100ng) por 24, 48 e 72 horas.....	66
Tabela 4 - Análise do ciclo celular das linhagens A549 e HK2 após estímulo com EGF (100ng ou 200ng) por 48 horas.....	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Câncer	20
1.2 Receptor do fator de crescimento Epidermal (EGFR)	23
1.3 EGFR e o câncer de pulmão	28
1.4 CULTURA TRIDIMENSIONAL	32
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Cultura de células em monocamada e no modelo tridimensional	37
3.2 Reagentes	39
3.3 Curva de crescimento das células cultivadas em monocamadas e esferoides.....	39
3.4 Hibridização fluorescente in situ	40
3.5 Imunofluorescência (mocamada e esferoides)	41
3.6 Medida da área dos esferoides	44
3.7 <i>Western blotting</i>	44
3.8 RTPCR.....	47
3.9 Tratamentos e análise do número de células	47
3.10 Ciclo celular.....	48
3.11 Índice mitótico.....	49
3.12 Teste de viabilidade celular	49
3.13 Ensaio de ferida	50
3.14 Microscopia em tempo real (time lapse)	51
3.15 Microscopia eletrônica de transmissão.....	52
3.16 Incorporação por brdu.....	53
3.17 Análise estatística	54
4 RESULTADOS.....	55
4.1 Efeitos da ativação do EGFR em células cultivadas em monocamada.....	55
4.1.1 <i>Curva de Crescimento</i>	55

4.1.2 Número de cópias do gene ErbB1 e expressão de EGFR nas linhagens A549 e HK2.....	57
4.1.3 Determinação da localização celular do EGFR após ativação por estímulo com EGF.....	60
4.1.4 ativação do EGFR pelo ligante EGF não induz proliferação celular.....	65
4.1.5 Inibidor da fosforilação do receptor EFGR (AG1478) não interferiu na proliferação celular.....	71
4.1.6 EGF promoveu alterações morfológicas que foram suprimidas pela inibição com AG1478.....	75
4.1.7 EGF aumentou a migração celular das linhagens A549 e HK2.....	77
4.1.8 O EGF induziu a transição epitélio mesenquimal para promover a migração?.....	82
4.2 Cultura 3D – Cultivo, morfologia e caracterização dos esferoides.....	86
4.2.1 Cultivo das células A549 e HK2 em placas não aderentes.....	86
4.2.2 Cultivo das células A549 e HK2 em placas não aderentes sob rotação de 10 rpm.....	87
4.2.3 Cultivo das células A549 e HK2 em placas não aderentes sob rotação de 20 rpm.....	88
4.2.4 Cultivo das células A549 e HK2 em placas não aderentes sob rotação alternada de 20 rpm.....	88
4.2.5 Caracterização morfológica dos esferoides por coloração dos microfilamentos de actina e núcleo.....	90
4.2.6 Presença de figuras apoptóticas no centro dos esferoides da linhagem A549.....	94
4.2.7 Caracterização dos esferoides por microscopia eletrônica de transmissão.....	95
4.2.8 Curva de crescimento, ciclo celular e área dos esferoides das linhagens A549 e HK2....	97
4.2.9 Nível de expressão de proteínas e RNAm nos esferoides das linhagens A549 e HK2 ...	104
4.3 Efeitos da ativação do EGFR por EGF nas células cultivadas em um modelo tridimensional (esferoides).....	108
4.3.1 O estímulo com EGF não promoveu a proliferação celular nos esferoides.....	108
4.3.2 Expressão de p-ERK e p-Akt nos esferoides e na cultura em monocamada das linhagens A549 e HK2.....	113
4.3.3 O estímulo com EGF causou alterações morfológicas nos esferoides da linhagem A549.....	116
4.4 Investigação das possíveis vias de sinalização citoplasmáticas, envolvidas com a migração celular e ativadas pela via EGF-EGFR, nas culturas em monocamada e nos esferoides.....	118
5 DISCUSSÃO	126
5.1 Caracterização do EGFR nas linhagens A549 e HK2 cultivadas em monocamada.....	126
5.2 Estímulo com egf promove migração celular em células cultivadas em monocamada ..	129
5.3 A cultura 3D das linhagens A549 e HK2.....	133
5.4 caracterização nos esferoides das linhagens A549 e hk2: morfologia e expressão proteica.....	135
5.5 Estímulo com egf promove migração das células dos esferoides por meio da sinalização de erk e akt.....	140

6 CONCLUSÃO.....	144
REFERÊNCIAS	145
ANEXO	156
A - Independent of ErbB1 gene copy number, EGF stimulates migration but is not associated with cell proliferation in non-small cell lung cancer.....	156

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer é uma doença em que células, contendo mutações ou alterações na expressão de certos genes, modificam seu padrão de proliferação celular. Essas células podem promover a ruptura de funções realizadas pelo tecido e ainda podem adquirir a capacidade de invadir outros tecidos. Portanto, o processo de carcinogênese envolve diversas etapas associadas a estas alterações genéticas que contribuem para a transformação do fenótipo normal para o maligno e progressão tumoral.

As células normais tornam-se neoplásicas após adquirirem uma sucessão de características que promovem distúrbios em diversas vias de sinalização celular, como por exemplo: auto-suficiência dos sinais para proliferação celular, inativação de supressores de proliferação, escape da destruição imunológica, aquisição de potencial replicativo imortal, promoção de inflamação pelo tumor, ativação de invasão e metástase, indução da formação de novos vasos sanguíneos, instabilidade genômica e mutação, escape dos mecanismos de apoptose e desregulação do metabolismo energético celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer vem sendo causa de grande número de óbitos por todo o mundo. Em 2008, cerca de 12,7 milhões de casos de câncer e 7,6 milhões de mortes decorrentes do câncer foram descritos mundialmente. Os tipos de câncer mais diagnosticados são o de mama em mulheres e o de pulmão em homens, esses são os tipos de câncer que mais frequentemente levam a óbito em países desenvolvidos ou em desenvolvimento economicamente (Figura 1), com exceção do câncer de pulmão que é precedido pelo câncer de próstata em homens nos países desenvolvidos economicamente (JEMAL et al., 2011).

As estimativas realizadas para 2014 mostraram que ocorrerão no Brasil 576 mil casos novos de câncer e entre os mais incidentes estará o câncer de pulmão. São esperados 27 mil novos casos desse tipo de câncer, sendo o segundo tipo de câncer mais incidente em homens e o quarto mais incidente em mulheres (Figura 2). A ocorrência do câncer de pulmão está relacionada ao tabagismo, que está associado a mais de 80% dos casos. Fumantes têm cerca de 20 a 30 vezes mais chances de desenvolver essa doença. Outro fator

causador do câncer de pulmão, frequente em 5% a 10% dos casos, é a exposição a compostos carcinogênicos, como por exemplo, a fibras de amianto. Outros riscos são infecções pulmonares frequentes, tuberculose e deficiência ou excesso de vitamina A (fonte: INCA*). O câncer de pulmão também é responsável por grande incidência de morte nos Estados Unidos, Europa, Japão e China (FERLAY et al., 2007; JEMAL et al., 2008, 2009, 2011; MAXWELL, 2001; YANG et al., 2005).

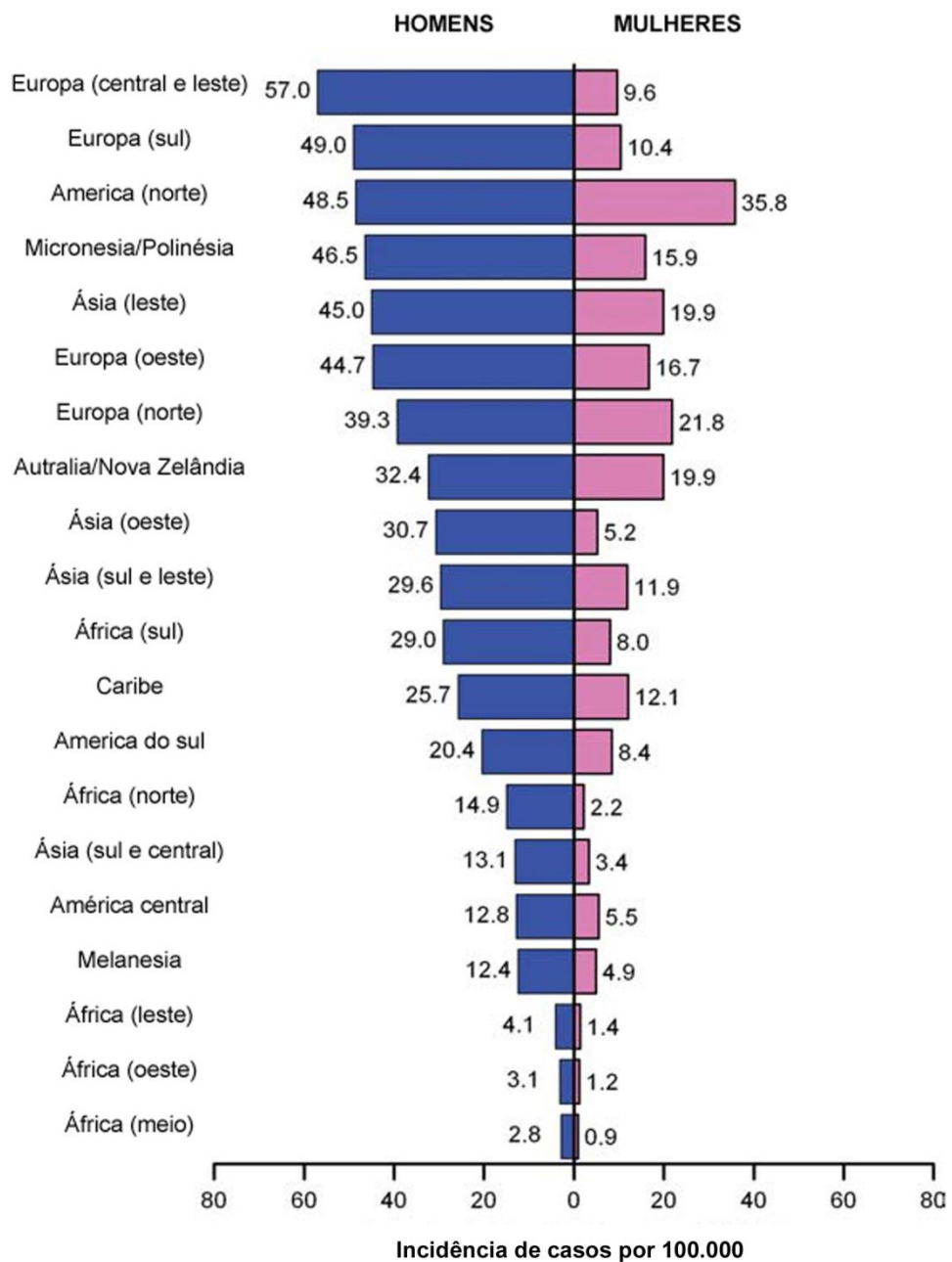



Figura 1 - Incidência do câncer de pulmão no mundo padronizada pela idade e gênero. Fonte: Modificado de JEMAL et al. (2011).

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%		Homens	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Côlon e Reto	17.530	6,4%
Côlon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 2 - Distribuição proporcional por gênero dos dez tipos de câncer mais frequentes no Brasil, estimados para 2014. Fonte: INCA*

Os cânceres de pulmão são classificados como carcinoma de células pequenas de câncer de pulmão (10-15% dos casos e associado com o fumo), tumores carcinóides de pulmão (menos de 5% dos casos) e carcinoma de células não pequenas de câncer de pulmão (*NSCLC: non small cell lung cancer*, 85-90% dos casos); com os subtipos: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de células grandes (SHARMA; SETTLEMAN, 2009). Em geral, os adenocarcinomas se localizam mais próximos aos alvéolos e se caracterizam pela presença de uma diferenciação glandular e ou a produção de mucina. O adenocarcinoma representa o subtipo histológico dominante em comparação com todos os tipos de câncer de pulmão. O carcinoma de células escamosas aparece mais próximo às vias aéreas (traqueia), é um tumor mais central e está fortemente associado ao tabagismo e a inflamação crônica. O carcinoma de células grandes é diagnosticado por exclusão, quando o tumor não apresenta características morfológicas de adenocarcinoma e de carcinoma de células escamosas (DAVIDSON et al., 2013).

As células de câncer de pulmão frequentemente apresentam alterações em sua genética molecular, entre as quais se podem citar: mutação nos genes supressores de tumor p53, Rb1 e PTEN, alterações no p16, superexpressão do gene ciclina D1, mutações pontuais na família de protooncogenes RAS, mutação de BRAF e de NF1, amplificação de fatores de transcrição MYC e SOX2 e alterações nos receptores tirosina quinase, amplificação de MET, mutação e amplificação do gene HER2/neu e do gene ErbB1 (EGFR) (BLANCO et al., 2010; CHEN et al., 2014; SEKIDO et al., 2003). A superexpressão de ErbB1 é mais encontrada em carcinoma de pulmão do que a do gene HER2/neu (HIRSCH et al., 2003). O ErbB1 é um gene

que codifica o receptor do fator de crescimento epidermal, o EGFR. A amplificação de ErbB1 e aumento de expressão de EGFR é comumente encontrada em câncer de pulmão.

1.2 RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGFR)

A descoberta do EGFR foi muito importante para o desenvolvimento de diversos estudos com os receptores do tipo tirosina quinase. Em 1962, Stanley Cohen isolou e caracterizou uma proteína da glândula salivar que, quando injetada em ratos recém-nascidos, induziu abertura da pálpebra e a erupção dentária precoce (COHEN, 1962). Essa substância foi chamada de fator de crescimento epidermal (EGF) e também foi capaz de estimular o crescimento de células epiteliais (COHEN, 1965). Em 1975, Graham Carpenter adicionou EGF a fibroblastos de diferentes espécies e constatou que havia sítios específicos para a ligação de EGF nas superfícies celulares (CARPENTER et al., 1975). Três anos depois, Carpenter et al. (1978) identificaram o receptor EGFR, que aumentou a incorporação de P^{32} em resposta ao tratamento com EGF em células A431. Então foi proposto que a fosforilação de componentes da membrana gerava sinais intracelulares que poderiam regular a proliferação. O conceito que a geração de sinais por meio da fosforilação de tirosinas ganhou suporte experimental em 1980. O experimento realizado por Hunter e coautores mostrou que o estímulo com EGF levou à rápida fosforilação da tirosina de proteínas intracelulares abaixo dos receptores ativados, em células A431 (HUNTER et al., 1981).

O desenvolvimento das técnicas de clonagem molecular, nas décadas de 70 e 80, foi muito importante para as pesquisas com receptores do tipo tirosina quinase. Primeiramente foi elucidada a sequência do ligante EGF e os estudos foram intensificados na identificação do receptor de superfície de membrana que promove atividade mitogênica sob efeito do EGF. O EGFR foi originalmente identificado como um oncogene devido a sua homologia com o v-ERBB, uma proteína retroviral (DOWNWARD et al., 1984). Em 1984, a sequência do cDNA do EGFR humano foi isolada e caracterizada a partir de células normais de placenta e de células tumorais da linhagem A431. Foi detectada pela primeira vez a amplificação de EGFR nas células A431, isoladas de um carcinoma, mostrando uma anormalidade genética que desencadeou o desenvolvimento de muitos estudos (ULLRICH, 1984).

A partir da descoberta do EGFR, outros receptores do tipo tirosina quinase também foram descritos, já que são similares na estrutura e compartilham domínios similares ao encontrados no EGFR. Como por exemplo, o gene HER2 foi caracterizado e foi encontrado amplificado em 20% dos tumores de câncer de mama, sendo correlacionado com um pior prognóstico da doença. Nos anos 80 muitos trabalhos foram publicados descrevendo a superexpressão de EGFR em vários tumores epiteliais e sustentando a ideia da regulação da sinalização do EGFR como uma importante regra para o combate dos canceres humanos (GSCHWIND et al., 2004).

A família de genes ErbB, que codificam receptores tirosina quinase, é composta pelos genes ErbB1/EGFR, ErbB2/neu/HER2, ErbB3 e ErbB4. Esses receptores são expressos, em condições normais, em diversos tecidos de origem epitelial, mesenquimal e neural, relacionados com a proliferação e diferenciação celular. Experimentos realizados com camundongos nocautes para EGFR resultaram em letalidade dos embriões ou sobrevivência por somente 3 semanas. Foram também descritas falhas severas no desenvolvimento epitelial de diversos órgãos, incluindo pele, coração, pulmão e trato gastrointestinal. As múltiplas anormalidades associadas com a deficiência do EGFR confirmam que esse receptor é necessário para uma variedade de funções celulares e para o desenvolvimento do tecido epitelial (MAGNUSON et al., 1995; MIETTINEN, 1995; SIBILIA; ERWIN, 1993). As deficiências dos outros genes da família ErbB, HER2/ErbB3/ErbB4, mostraram também letalidade dos embriões e defeitos no desenvolvimento neural e cardíaco (ERICKSON et al., 1997; GASSMANN, et al., 1995; LEE et al., 1995).

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é codificado pelo gene ErbB1, localizado no cromossomo 7, na região 7p12. O EGFR é uma glicoproteína transmembrânica de 170kDa, que possui uma região extracelular, uma região transmembrana e um domínio tirosina quinase citoplasmático (JORISSEN et al., 2003; WANG et al., 1993). Este receptor é ativado quando seus ligantes específicos (EGF, TGF- α , anfirregulina, betacelulina, heparina ou epirregulina) se ligam ao domínio extracelular, propiciando assim a formação de dímeros com outro EGFR ativado, homodímero, ou com outro membro da família ErbB, particularmente o ErbB2, formando um heterodímero (Figura 3). A região extracelular do receptor possui 4 domínios e a formação do dímero só acontece quando o domínio 2 é exposto por ambos os receptores. A ligação do ligante promove uma alteração conformacional que propicia a exposição do domínio 2, ocorrendo assim a formação do

dímero (Figura 4). Ocorre então a autofosforilação do domínio tirosina quinase iniciando assim uma cascata de sinalização intracelular (CAPDEVILA et al., 2009; HYNES; LANE, 2005; LINGGI; CARPENTER, 2006).

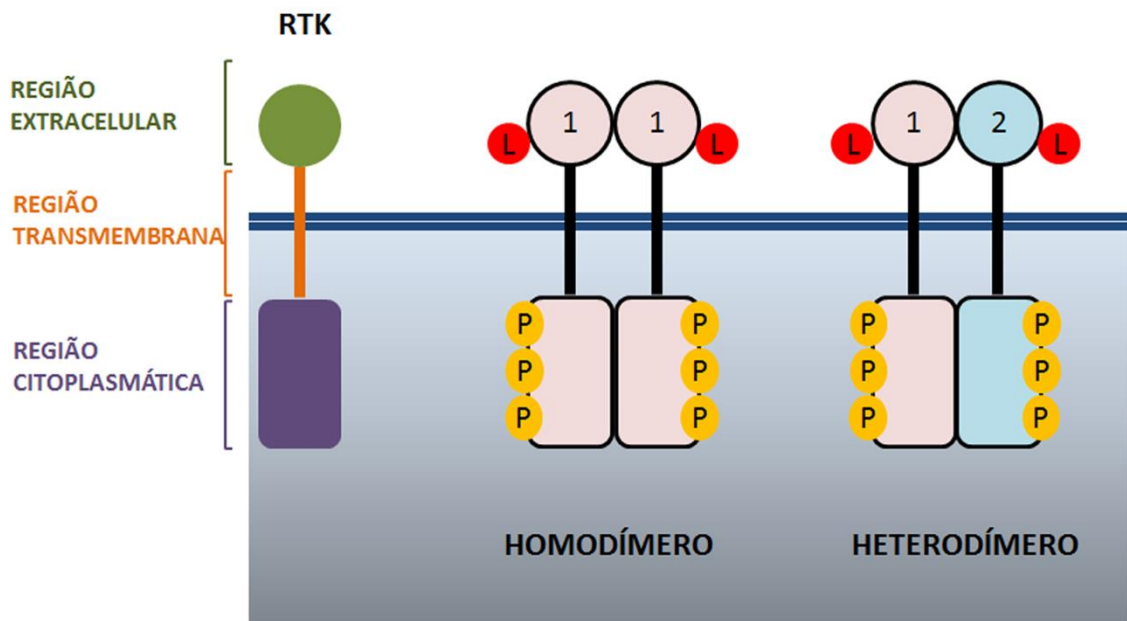


Figura 3 - Regiões da proteína EGFR. O EGFR possui 3 regiões: a região extracelular, a região transmembrana e a região citoplasmática. A ligação do ligante ocorre na região extracelular e promove a formação de homodímeros ou heterodímeros, promovendo assim a fosforilação da região citoplasmática desse receptor. O EGFR forma heterodímeros preferencialmente com o ERBB2.

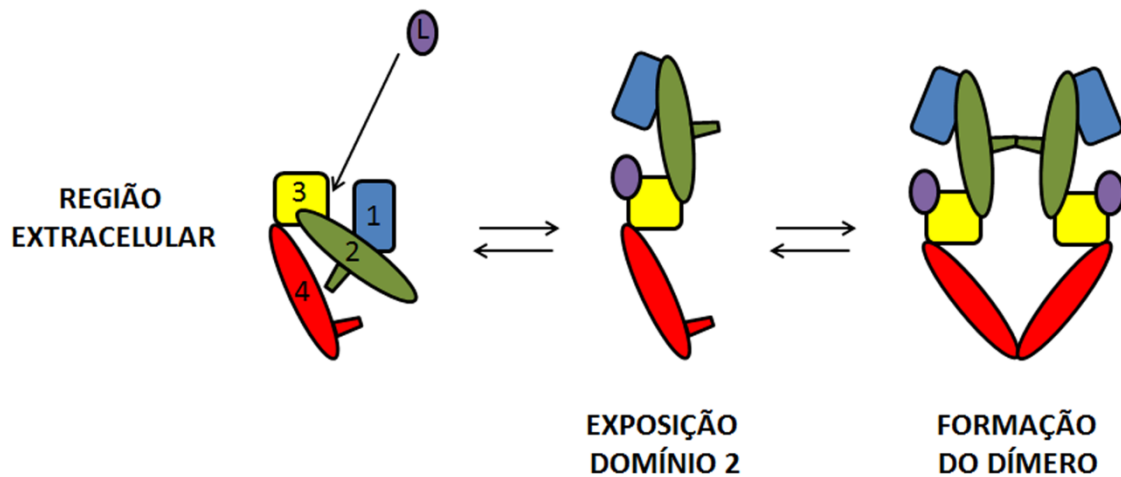


Figura 4 - A região extracelular do EGFR possui 4 domínios. A ligação do ligante ocorre no domínio 3, promovendo uma mudança conformacional no receptor e expondo o domínio 2, promovendo assim a formação do dímero. Fonte: Modificado de Ferguson et al. (2003).

O EGFR ativado é responsável por estimular inúmeras vias de sinalização intracelulares. Há duas vias principais de sinalização citoplasmática decorrentes da ativação de EGFR: RAS e PI-3 quinase/Akt (CAPDEVILA et al., 2009; SCHLESSINGER, 2000, 2004). A ativação de RAS é responsável por induzir uma cascata de fosforilação, levando a ativação de MAPKs, ERK1 e ERK2, que regulam a transcrição de moléculas ligadas à proliferação celular (LEWIS; SHAPIRO, 1998). A cascata de sinalização mediada por PI-3 quinase/Akt é responsável pela manutenção da sobrevivência celular (MANNING; CANTLEY, 2007). Entretanto, há outras vias de sinalização decorrentes da fosforilação de EGFR como, por exemplo, a ativação de STAT, que é um fator de transcrição. Além de proliferação e sobrevivência, o EGFR pode promover outros fenômenos como: migração, invasão, diferenciação, inibição de apoptose e angiogênese (CAPDEVILA et al., 2009; LURJE; LENZ, 2009). A imagem 5 mostra as principais vias de sinalização relacionadas ao EGFR.

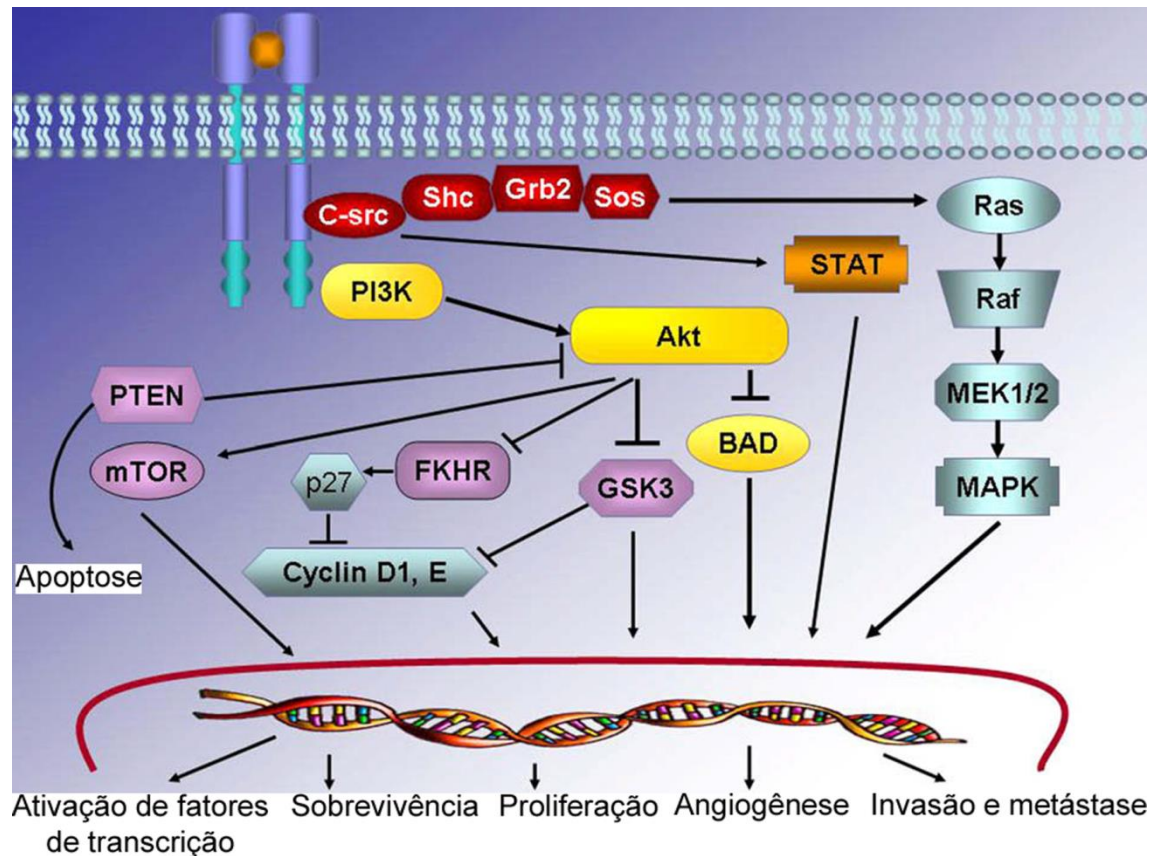


Figura 5 - Cascata de sinalização citoplasmática mediada pela ativação do EGFR. Fonte: Modificado de Capdevila et al. (2009).

Após a ativação, o EGFR é endocitado por meio de vesículas revestidas por clatrina, podendo ser reciclado para a membrana ou retido nos endossomos. Quando o ligante se dissocia do receptor ele pode ser reciclado e a não dissociação faz o complexo se acumular nos corpos multivesiculares, promovendo a degradação por lisossomos. A internalização rápida do receptor, que retira o mesmo da superfície celular encaminhando-o para degradação, é um fenômeno chamado de *downregulation* (CARPENTER, 2000; SORKIN; ZASTROW, 2002). Esse fenômeno diminui os níveis de EGFR na célula e atenua a sinalização citoplasmática.

Trabalhos mostraram que o EGFR pode ser também detectado no núcleo em células submetidas a tratamento com EGF, agindo como um fator de transcrição de ciclina D1 e Aurora-A (CARPENTER, 2003; HUNG et al., 2008; LIN et al., 2001), participando assim de uma possível via de sinalização nuclear. Após a internalização do EGFR, o receptor é detectado no retículo endoplasmático, se associando com o retrotranslocon Sec 61, voltando para o

citosol e chegando ao núcleo por meio de sua interação com o HSP70 (LIAO; CARPENTER, 2007). Existem poucos estudos na literatura que focam a ação do EGFR no núcleo, mas seu envolvimento na ativação de genes ligados a divisão celular, como Aurora-A e ciclina D1, pode estar associado ao processo de transformação maligna.

1.3 EGFR E O CÂNCER DE PULMÃO

A sinalização do EGFR tem impacto em muitos aspectos na biologia tumoral. Alterações no EGFR são frequentes em diversos tipos de câncer e podem promover a sobrevivência celular, proliferação, invasão, reparo e angiogênese (HYNES; LANE, 2005). A presença de superexpressão de EGFR varia entre os diferentes tumores, incluindo os de cabeça e pescoço (80-100%), renal (50-90%), mama (14-91%), colo retal (25-77%), ovário (35-70%), glioma (40-63%), pâncreas (30-50%), bexiga (31-48%) e pulmão (40-80%) (HERBST; SHIN, 2002). A superexpressão do EGFR em tumores tem sido associada com maior agressividade da doença, pior prognóstico e baixo índice de sobrevivência, baixa resposta a terapia e desenvolvimento de resistência para agentes citotóxicos em alguns tipos de tumores (BRABENDER et al., 2001).

Hirsch et al. (2003) observaram em uma análise em larga escala que a superexpressão de EGFR nos tumores de pulmão não está associada com a idade, sexo, estágio patológico, estado do tumor ou costume de fumar dos pacientes. Significantes diferenças estão associadas à diferenciação histológica em que tumores bem diferenciados expressam altos níveis de EGFR. Observaram também uma relação entre a amplificação gênica e a expressão de EGFR, pois o EGFR foi encontrado superexpresso em todos os tumores com amplificação gênica, fato observado também por Amann et al. (2005) em linhagens celulares derivadas de carcinoma de pulmão.

Foi também avaliada por Hirsch et al. (2003) a taxa de sobrevivência dos pacientes, que se apresentou menor quando havia a presença de aumento no número de cópias do gene ErbB1. Foi visto ainda que o EGFR apresenta-se superexpresso em 62% dos tumores de pulmão humanos diagnosticados como de células não pequenas, crescendo o interesse em seu uso no prognóstico dessa doença. Trabalhos mais recentes mostram que esse receptor

encontra-se superexpresso em 40-80% dos pacientes diagnosticados com *NSCLC* (SEQUIST; LYNCH, 2008; WHEATLEY-PRICE; SHEPHERD, 2008).

Além da expressão e amplificação, mutações no EGFR também foram descritas em células não pequenas de pulmão humano (LYNCH et al., 2004; PAEZ et al., 2004; PAO et al., 2004). As mutações foram primeiramente localizadas no domínio tirosina quinase com deleções no exon 19 e uma mutação pontual no exon 21 (L858R), substituição de leucina para arginina no aminoácido de posição 858 (PAO; CHMIELECKI, 2010). Também foram detectadas mutações em outros locais do domínio tirosina quinase, incluindo inserções no exon 20 (YASUDA et al., 2013). Câncer de pulmão com mutações é mais associado com adenocarcinoma e não associado com o tabagismo (ARTEAGA; ENGELMAN, 2014).

Okabe et al. (2007) sugeriram em seu trabalho que mutações no gene ErbB1 estão intimamente associadas com a amplificação desse gene e que linhagens de células de pulmão que apresentam esses dois aspectos também apresentam maior expressão do EGFR. Amann et al. (2005) também verificaram que as mutações no EGFR estão associadas com amplificação gênica nas amostras de biópsia. Essas mutações podem causar alterações na conformação do receptor, propiciando a formação de sítios com maior afinidade para a ligação de drogas. Verificou-se, por exemplo, que o aumento do número de cópias do gene ErbB1 em tumores de pulmão é um marcador positivo para a maior sobrevivência dos pacientes submetidos a terapia com Gefinib, inibidor do domínio tirosina quinase de EGFR (HIRSCH et al., 2005). A técnica de FISH (hibridização fluorescente *in situ*) é utilizada para a detecção desse gene e pode ser utilizada como possível teste para a triagem de pacientes para a terapia com inibidores (VARELLA-GARCIA, 2006).

O tratamento do câncer de pulmão com a quimioterapia citotóxica é utilizado para tratar de forma paliativa os sintomas e prolongar a sobrevivência dos pacientes, mas é necessário o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento. A amplificação e mutações no gene ErbB1 e a superexpressão de EGFR estão sendo utilizados como biomarcadores para a seleção de pacientes ao tratamento com inibidores de EGFR. Os primeiros inibidores a se tornarem clinicamente disponíveis para tratamento de células não pequenas de câncer de pulmão foram os que bloqueiam a ativação do domínio tirosina quinase por competirem e se ligarem ao sítio de ATP, de maneira reversível, na região citoplasmática do EGFR, como por exemplo, o Erlotinib e o Gefitinib (MITSUDOMI, 2010). Anticorpos monoclonais humanizados que competem com os sítios de ligação de EGFR

também foram desenvolvidos, como por exemplo, o Cetuximab e o Matuzumab (MITSUDOMI, 2010).

Mutações em determinados exons do gene ErbB1 podem interferir na ação dos inibidores usados na terapia para o EGFR. Dependendo da mutação, ocorre uma maior sensibilidade ou uma insensibilidade desse receptor a esses compostos. A presença de mutações está associada ao aumento da afinidade dos inibidores Erlotinib e Gefitinib ao receptor, em comparação com a forma não mutada do receptor (CAREY et al., 2006; YUN et al., 2007). Muitos trabalhos mostram a relação dessas mutações com os inibidores para o EGFR (GANDHI et al., 2009; MILLER, 2008; PAO et al., 2005; ZHU et al., 2008).

As células tumorais também podem adquirir mecanismos de resistências aos inibidores. As células tumorais que contêm mutações no EGFR podem desenvolver um segundo tipo de mutação, como a substituição de uma treonina por uma metionina no amino ácido 790, T790M, e as células podem se tornar resistentes aos inibidores do domínio tirosina quinase (ARTEAGA; ENGELMAN, 2014). Também pode ocorrer a ativação de vias de sinalização paralelas, como a amplificação de MET, e uma transformação fenotípica das células, sendo assim um tipo de resistência adquirida ao tratamento com os inibidores (MATIKAS et al., 2015). Tokumo et al. (2006) mostraram que pacientes apresentaram resistência ao tratamento com *Getifinib* apesar de serem portadores de mutação no exon 19, que confere maior sensibilidade a tratamento com esse inibidor, e de apresentarem amplificação gênica do gene ErbB1.

Os diferentes tipos de inibidores vêm sendo combinados entre si e com a quimioterapia tradicional (MATIKAS et al., 2015). Novas gerações de inibidores também vêm sendo desenvolvidas e testadas, como o *Afatinib*, um inibidor que também compete pelo domínio tirosina quinase, mas que pode se ligar ao EGFR com a substituição T790M de forma irreversível, mutação que conferia resistência à primeira geração de inibidores (ASAMI; ATAGI, 2014). Esse inibidor foi aprovado pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) em 2013 para uso em pacientes com células não pequenas de câncer de pulmão que apresentam mutações para o EGFR (MATIKAS et al., 2015).

A ativação de EGFR por meio de EGF também é capaz de induzir a transição epitélio mesenquimal (TEM) (Figura 6), contribuindo para um aumento da mobilidade celular (GAN et al., 2010; JARAMILLO et al., 2008; MOUSTAFA et al., 2012). A transição epitélio mesenquimal é um processo em que células epiteliais imóveis e polarizadas adquirem, por

meio de alterações moleculares, características como: perda da adesão célula a célula, perda das junções celulares e a reorganização do citoesqueleto. Estas características resultam na perda da polaridade apical e aquisição de morfologia fusiforme, assim as células epiteliais adquirem características de células mesenquimais, propiciando o aumento da capacidade de migração celular. Este importante processo foi inicialmente reconhecido durante estágios do desenvolvimento embrionário e recentemente também foi identificado por promover a progressão do câncer, induzindo metástase e invasão de carcinomas (MOUSTAFA et al., 2012).

Este processo começa no tumor primário quando as células tumorais modificam a adesão entre as células, regulando negativamente a expressão de proteínas de adesão celular, como a E-caderina, e regulando positivamente a expressão de proteínas que conferem características relacionadas com a motilidade celular, conferindo fenótipo de células mesenquimais (BARR et al., 2008). Outra característica de células mesenquimais é a expressão do filamento intermediário vimentina, utilizado como marcador da transição epitélio mesenquimal. Células de câncer de pulmão tratadas com EGF apresentam diminuição na expressão de E-caderina, aumentando a capacidade de invasão das células tumorais (LU et al., 2003), e promove o controle de Snail, fator de transcrição envolvido com a TEM, pela via de sinalização PKC/GSK-3 β (LIU et al., 2014).

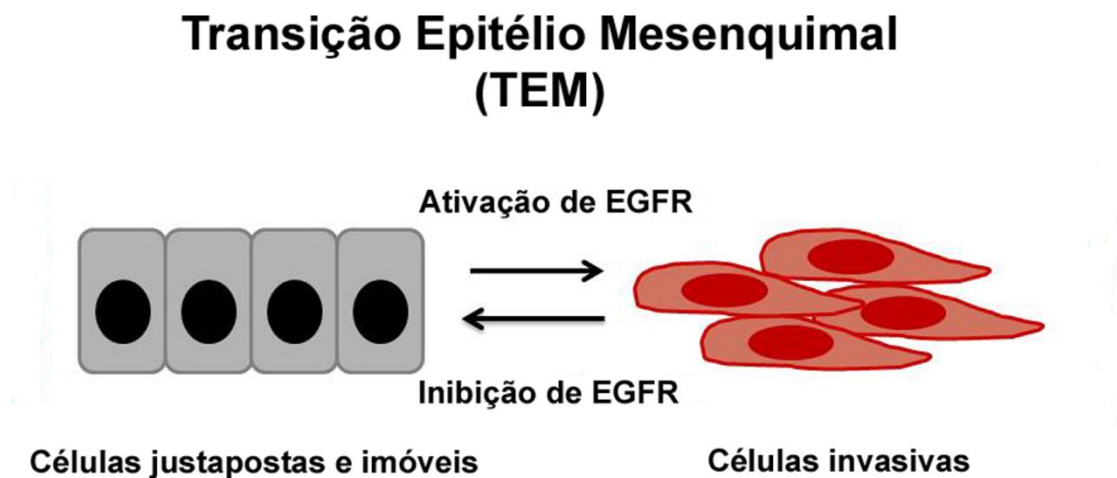


Figura 6 - Transição epitélio mesenquimal (TEM) e a modulação pelo EGFR. A ativação de EGFR altera a diferenciação celular pela indução de TEM acompanhada pela expressão de marcadores mesenquimais como vimentina, fibronectina e N-caderina. Em contraste, a inibição de EGFR por inibidores do domínio tirosina quinase ou anticorpos, provoca a diferenciação, detectada por marcadores como E-caderina e ZO-1. Fonte: Modificado de Moustafa et al. (2012).

1.4 CULTURA TRIDIMENSIONAL

A cultura de células tem grande importância por permitir a manutenção de células vivas em laboratório, propiciando o seu estudo. Essa técnica começou a ser desenvolvida por Harrison em 1907, que conseguiu manter células de embrião de anfíbios vivas em seu laboratório. Alexis Carrel, após ter acesso ao trabalho realizado por Harrison, conseguiu desenvolver um tipo de meio de cultura para manter células derivadas de coração de galinha em laboratório por mais tempo. Durante sua pesquisa percebeu que as células que tinham mais contato com o meio de cultura eram as mais viáveis e passou a cultivá-las sobre uma superfície formada por fios de seda, permitindo uma melhor interação das células com o meio, sendo talvez o primeiro cultivo celular em três dimensões. Johannes Holtfreter, em 1944, desenvolveu um método de cultivo tridimensional que impedia a adesão celular às placas de cultivo, primeiramente adicionando ágar em sua superfície e depois desenvolvendo um aparelho que mantivesse a cultura sob rotação. A partir de 1950 a cultura tridimensional passou a ter crescente interesse científico e foi cada vez mais aprimorada (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

Células cultivadas em monocamada, cultura em 2 dimensões (2D), não mantêm as mesmas características que possuíam *in vivo*. Devido a isso, há grande interesse no desenvolvimento de culturas celulares que mimetizem as características encontradas *in vivo*, por exemplo, para o estudo do comportamento de células tumorais diante de drogas anticâncer (PRESTWICH, 2008). A cultura em três dimensões (3D) consiste em uma maneira de cultivo que propicia às células realizarem interações célula-célula ou célula-matriz por todo o limite celular, sendo uma condição de cultura mais próxima do observado *in vivo* (BOKHARI et al., 2007; CUKIERMAN et al., 2001).

O aumento da interação entre as células e com a matriz, observado no modelo de cultivo em 3D, pode aumentar a diferenciação celular (AMARAL et al., 2010, 2011; HALL et al., 1982; WILLIAM et al., 1992), atuar na sinalização celular devido aos componentes da matriz extracelular (PAGE et al., 2013), modificar o padrão de expressão gênica antes observado na cultura 2D (LUCA et al., 2013; SPENCER et al., 2010) e alterar a expressão de moléculas envolvidas com a adesão célula-matriz (integrinas) e célula-célula (caderinas) (SANTINI et al., 2000). Estudos mostraram que a expressão de integrinas e a distribuição da

E-caderina em esferoides são muito semelhantes ao encontrado *in vivo* (HAUPTMANN et al., 1995; WALEH et al., 1994).

A cultura 3D pode ser utilizada para diversos fins, tanto em pesquisa básica como aplicada. O cultivo de células tumorais 3D tem trazido grande interesse para seu uso no estudo do câncer, como por exemplo, em pesquisas que testam a eficiência de drogas (NIERO et al., 2014). Na cultura 3D as células estão dispostas em muitas camadas conferindo uma barreira biológica para a difusão de drogas, que terá que se difundir entre essas camadas, similar ao que ocorre *in vivo* (PAGE et al., 2013).

Existem vários modelos de cultura de células que propiciam o crescimento de células em um sistema tridimensional. As células podem ser cultivadas em arcabouços contendo hidrogel com materiais naturais, como matrigel (SONG et al., 2014) e colágeno tipo I (SZOT et al., 2011), em uma matriz inerte (géis sintéticos) como alginatos de hidrogel (ROWLEY et al., 1999), em placas com baixa aderência para obtenção de esferoides multicelulares (FRIEDRICH et al., 2007; HIRSCHHAEUSER et al., 2010), utilizando esferas (*microcarrier beads*) e com cultura de explantes organotípicos (PAGE et al., 2013).

Os esferoides multicelulares apresentam similaridade na morfologia, heterogeneidade celular e características funcionais de tumores sólidos, mimetizando microrregiões de tumores avasculares, regiões de tumores entre capilares e micro metástases. As células dos esferoides são expostas a um fornecimento de oxigênio e nutrientes de forma não uniforme, então as células localizadas em sua periferia refletem a situação de células tumorais próximas a vasos sanguíneos, que estão em plena atividade, já as células localizadas em seu interior se tornam quiescentes e acabam morrendo por apoptose ou necrose. Essa técnica de cultivo tridimensional é utilizada por ser de fácil manipulação e de ter grande reprodutibilidade (FRIEDRICH et al., 2007; SANTINI; RAINALDI, 1999).

Há trabalhos que utilizam a cultura 3D para estudos em câncer de pulmão. São várias as formas de cultivo 3D utilizadas nesses estudos: esferoides (OLABIRAN et al., 1994; YANG et al., 2009), matrigel (LI et al., 2012; NGUYEN et al., 2013), cultivo de células em um modelo 3D *ex vivo* (MISHRA et al., 2012), dentre outros.

As opções de tratamento para o câncer de pulmão causado por NSCLC são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapia sequencial ou de combinação simultânea (GANDARA et al., 2005). Os tratamentos convencionais, na maioria das vezes, não são eficazes para conter

esse tipo de câncer e devido a isso o desenvolvimento de novas estratégias de terapia vem crescendo, tendo em vista alvos moleculares, como por exemplo, o EGFR. Como citado anteriormente, as células do câncer de pulmão frequentemente manifestam alterações moleculares, incluindo alterações no EGFR. Desta forma vem crescendo o interesse no desenvolvimento de drogas que tenham como alvo essa proteína para utilização no tratamento do câncer de pulmão. É interessante o uso da cultura 3D para estudos relacionados com o EGFR em câncer de pulmão, já que os resultados seriam mais próximos do observado *in vivo*. Entretanto, há poucos trabalhos focados nesse aspecto.

Lee et al. (2011), por exemplo, cultivaram células epiteliais broncoatraqueais humanas em um sistema 3D de cultura, utilizando o método de cultura tridimensional organotípico, com interface ar-líquido. Verificaram proliferação celular induzida pelo EGF, que foi inibida pelo tratamento com erlotinib, inibidor do domínio tirosina quinase de EGFR. Os autores concluíram que a hiperplasia de células do brônquio pode ser modelada *in vitro* usando células cultivadas em um modelo 3D. Outro trabalho mostrou o desenvolvimento de uma câmara para cultura celular constantemente suplementada com meio fresco (WANG et al., 2013). Células não pequenas de câncer de pulmão foram encapsuladas com extrato de membrana basal e colocadas na câmara de cultura. A cultura 3D foi estimulada com EGF e houve formação de invadopódios e essas protrusões da membrana diminuíram sua incidência quando utilizado um inibidor de metaloproteinase de matriz. Esse trabalho demonstrou que esse método de cultura 3D foi eficiente para elucidar mecanismos de invasão.

Li et al. (2013) selecionaram células com menor poder de invasão a partir da linhagem A549. Essas células foram então submetidas à radiação ionizante e as que sobreviveram foram cultivadas. As células previamente irradiadas possuíam prolongamentos celulares, tanto na cultura 2D e nos esferoides, adquirindo maior poder de invasão. A proteína EGFR e sua forma fosforilada (p-EGFR) estavam mais expressas nas células previamente irradiadas. Tratamentos com inibidor de EGFR causaram diminuição dos prolongamentos encontrados nas células cultivadas em monocamada e nos esferoides.

Stratmann et al. (2014) utilizaram uma matriz extraída de tecido de intestino delgado de porco para cultivar as linhagens derivadas de câncer de pulmão. Os autores observaram que as células cultivadas no modelo 3D apresentavam a expressão de um marcador tumoral (MUC1) similar à expressão observada *in vivo*. A cultura 2D não apresentou o mesmo

resultado. A resposta à droga gefitinib, responsável pela inibição do domínio tirosina quinase de EGFR, nas células cultivadas em um modelo 3D também foi mais próxima à resposta encontrada *in vivo*.

Dentre os trabalhos mais recentes que utilizaram a cultura 3D para cultivo de células derivadas de câncer de pulmão está o de Ekert et al. (2014). Os autores comparam a expressão e fosforilação do EGFR na cultura 3D com a cultura 2D, relacionando com a proliferação. Os esferoides apresentaram fosforilação basal do EGFR maior do que o encontrado na cultura 2D e as células dos esferoides se mostraram mais sensíveis aos inibidores de EGFR (EKERT et al., 2014).

Os trabalhos supracitados focam no desenvolvimento de culturas 3D que possibilitem o teste de drogas, propiciando situações mais próximas do encontrado *in vivo*. Também investigam a ação do estímulo e inibição de EGFR, mostrando o envolvimento desse receptor na migração e invasão celular.

A análise do presente trabalho foi realizada em linhagens celulares derivada de câncer de pulmão humano em duas culturas celulares diferentes, em monocamada (2D) e cultura tridimensional (3D). A cultura 3D possibilita estudar o comportamento das células tumorais em condições mais próximas às dos tumores *in vivo*. A interação das células com o microambiente deve resultar em informações relevantes. Há poucos estudos com células derivadas de câncer de pulmão em cultivo 3D, mostrando assim a importância da realização desse estudo. Com isso, pudemos encontrar aspectos diferentes em relação à ativação e sinalização de EGFR, já que este é um receptor de membrana e a cultura 3D mimetizaria mais fielmente as interações intercelulares. Assim, pretende-se estabelecer as características de proliferação e migração destas células em consequência da ativação ou inibição de EGFR.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação da expressão de EGFR com os números de cópias do gene ErbB1 e os efeitos da expressão de EGFR na proliferação e migração das células de duas linhagens de células não pequenas de câncer de pulmão, na presença e ausência de seu ligante EGF e do inibidor do domínio tirosina quinase do EGFR, o AG1478. O trabalho comparou tais parâmetros em células cultivadas em monocamada e em esferoides.

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- ❖ Relacionar o número de cópias do gene ErbB1 com os níveis de expressão de EGFR;
- ❖ Verificar os efeitos da ativação ou inibição do domínio tirosina quinase de EGFR na proliferação celular;
- ❖ Padronizar um método para cultivo de esferoides, na ausência de matriz extracelular exógena, a partir das linhagens A549 e HK2;
- ❖ Avaliar os efeitos da ativação e inibição de EGFR nas células cultivadas em esferoides, visando compreender e comparar os efeitos encontrados com os resultados obtidos com a cultura 2D;
- ❖ Investigar o papel da ativação de EGFR na migração celular, relacionando duas importantes vias de sinalização mediadas por esse receptor: ERK e Akt.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS EM MONOCAMADA E NO MODELO TRIDIMENSIONAL

A linhagem celular A549 foi obtida da ATTC (*American Type Culture Collection*) (Manassas, VA, Estados Unidos da América) através do Banco de Células do Rio de Janeiro. A linhagem HK2 foi estabelecida no laboratório (BONALDO et al., 1991). Para as culturas em monocamada (2D), ambas as linhagens foram mantidas em estufa úmida a 37 °C em atmosfera contendo 5% CO₂ e cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Minimum Essential Medium* (DMEM, Sigma, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), (Cultilab, São Paulo, Brasil). As células foram cultivadas em garrafas de 25 mL.

Para a formação dos esferoides (figura 7), cultura tridimensional (3D), as células cultivadas em monocamada foram submetidas a uma dissociação enzimática com uma solução de tripsina 0,2% + EDTA 0,02% (ácido etilenodiamino tetra-acético). Após a neutralização da ação da tripsina com meio de cultura, as células foram contadas em citômetro de fluxo *Guava EasyCycle mini* (Millipore Biosciences Tescicula, CA, Estados Unidos da América) e 4×10^5 células foram inoculadas em placas de Petri com 60 mm de diâmetro, em 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37 °C por 24 horas. Após esse período, as células e agrupamentos de células foram cuidadosamente ressuspensos com micropipetador (1000 µL), para soltar as células que aderiram nas placas. As placas foram colocadas novamente na estufa sobre o agitador orbital Kasvi, modelo K40-3020, a 20 rpm, realizando uma rotação no sentido horário e outra no sentido anti-horário.

A cada 48 horas o meio foi trocado e para isso os esferoides foram transferidos das placas para tubos de fundo cônico de 15 mL. Depois de aproximadamente 10 minutos, pelo processo de sedimentação, os esferoides eram encontrados no fundo do tubo. Então o meio foi retirado e os esferoides foram ressuspensos com meio de cultura fresco e transferidos para novas placas (Figura 7). As imagens das culturas foram obtidas pelo microscópio de luz invertido digital EVOS AME-3302 (Aeleusden, Holanda).

Formação dos esferoides



Troca de meio

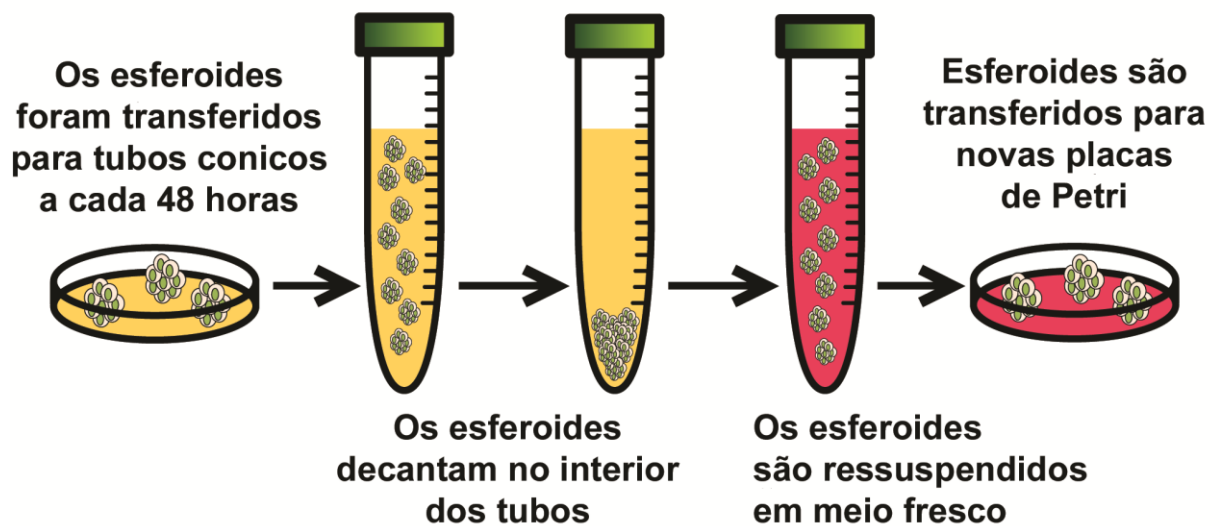


Figura 7 - Método utilizado para a cultura dos esferoides por 14 dias e troca de meio a cada 48 horas.

3.2 REAGENTES

O inibidor AG1478 foi adquirido da Merck e a concentração utilizada foi de 5 μM . O ligante EGF foi adquirido da Sigma-Aldrich e a concentração utilizada foi de 100 ng/mL e 200 ng/mL. Os inibidores LY294002 e U0126 foram adquiridos da Cell Signaling Technology e as concentrações utilizadas foram, respectivamente, 30 μM e 10 μM . Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo CEP-ICB n. 389/10).

3.3 CURVA DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS CULTIVADAS EM MONOCAMADAS E ESFEROIDES

As células das linhagens A549 e HK2 foram cultivadas em monocamada em placas de Petri de 35 mm, com inoculo inicial de 3×10^4 células. As células foram submetidas a tratamento enzimático com tripsina/EDTA e o número de células foi quantificado no 3º, 5º, 7º, 10º, 12º e 14º dia após o inoculo inicial. Para a realização da curva de crescimento das células dos esferoides, as células A549 e HK2 foram cultivadas para formação dos esferoides, como descrito acima. Em cada ponto de análise da curva, os esferoides foram coletados da placa e transferidos para um tubo de 15 mL e submetidos à centrifugação de 1000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o meio de cultura foi descartado e os esferoides foram ressuspendidos com 1 mL de tripsina/EDTA por 10 minutos, mantidos na estufa a 37 °C para acelerar o processo de dissociação das células. Após a dissociação completa das células foi adicionado 1 mL de meio de cultura ao tubo para neutralização da tripsina. Os esferoides foram dissociados nos seguintes dias de cultura após o inoculo inicial: 2º, 4º, 7º, 9º, 11º e 14º. Cinco mil células foram contadas e o restante delas foi fixado para a realização do ciclo celular do grupo experimental utilizado para análise. No mesmo dia em que as células dos esferoides eram dissociadas, o meio era trocado das placas que iriam continuar em cultura. As células foram quantificadas por meio do citômetro de fluxo *Guava EasyCycle mini* (Millipore Biosciences Tescicula, CA, Estados Unidos da América). Foram realizados três experimentos independentes.

3.4 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU*

As células A549 e HK2, cultivadas sobre lamínulas em placas de Petri de 35 mm, foram fixadas em etanol/ácido acético (proporção 3:1) por 30 minutos, posteriormente lavadas na solução SSC 2 X durante 5 minutos e em seguida lavadas em água destilada por 1 minuto. As lamínulas foram coladas em lâminas histológicas com as células aderidas voltadas para cima. Depois, as lâminas foram desidratadas sequencialmente em frascos contendo etanol 70%, 90% e 100% permanecendo 1 minuto em cada frasco e então submetidas à secagem em temperatura ambiente. Depois de secas, foram adicionados 10 µL da sonda SPEC EGFR/CEN 7 *Dual Color Probe* Zyto Vision (Bremerhaven, Alemanha) sobre as células fixadas que foram cobertas por outra lamínula e selada com cola.

As lâminas foram colocadas em uma placa quente a 75 °C por 5 minutos, para desnaturação do DNA, e transferidas para uma câmara úmida a 37 °C, onde permaneceram por 18 horas a 37 °C. Após esse período, a cola foi retirada e as lâminas foram submergidas em Washing Buffer A 1 X, a 37 °C por 1 minuto e submetidas a duas lavagens com Washing Buffer A 1 X, por 5 minutos cada a 37 °C.

Depois disso as lâminas foram lavadas em PBSA por 1 minuto e incubadas com TOPRO-3 em uma câmara úmida por 20 minutos. O excesso de TOPRO-3 foi removido lavando as lâminas com PBSA. Foi adicionado 10 µL de solução protetora de fluorescência (*anti-fading-Vectashield Burlingame, CA, Estados Unidos da América*) e novas lamínulas foram colocadas sobre as lamínulas, com as células voltadas para cima, e seladas. A quantificação do número de cópias do gene ErbB1 e do centrômero 7 foi realizada por meio de análise de imagens adquiridas com o auxílio do microscópio confocal de varredura a laser LSM 510 – ZEISS. Para a análise foram quantificados 100 núcleos de cada preparação histológica.

3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA (MOCAMADA E ESFEROIDES)

As células foram plaqueadas sobre lamínulas, para o cultivo em monocamada, em placas de Petri de 35 mm de diâmetro com o inóculo inicial de 3×10^4 células por placa. Depois dos tempos dos tratamentos, o meio de cultura foi retirado e 2 mL de PBSA foram adicionados nas placas para lavar as células e retirar o restante de meio de cultura. Foram realizadas três lavagens com PBSA. As células foram então fixadas com formaldeído 3,7% por 30 minutos e novamente lavadas três vezes com PBSA e tratadas com Triton X-100 (0,5% em PBSA) por 10 minutos. Após nova lavagem com PBSA, as células foram tratadas com solução de RNAase (10 mg/mL) por 30 minutos e novamente lavadas com PBSA.

As células foram incubadas em câmara úmida por 18 horas com os anticorpos primários. A tabela abaixo (Tabela 1) contém os anticorpos primários e secundários que foram utilizados neste trabalho, com suas devidas concentrações. Após o período de 18 horas, as células foram novamente lavadas em PBSA e incubadas com anticorpos secundários *anti-rabbit* ou *anti-mouse* (TRITC ou FITC) por 1 hora. Para evitar a evaporação, as lamínulas foram cobertas com Parafilm e colocadas em recipientes com papel molhado (câmara úmida) e mantidos fechados, no escuro.

Para a detecção dos microfilamentos de actina foi utilizado o corante fluorescente faloidina conjugado à FITC (isoticianato de fluorceina) (Sigma), na concentração de $7,5 \mu\text{M}$ em PBSA, por 15 minutos. A detecção do material genético presente no núcleo foi feita por meio de corante específico para ácidos nucleicos, o iodeto de propídeo, na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ (Sigma) por 15 minutos. Devido a isso realizamos um tratamento prévio com RNAase, para que o corante não detectasse o RNA, mas somente o DNA. Em algumas preparações foi utilizado DAPI, um corante específico para DNA. Após as colorações as células foram lavadas três vezes com PBSA.

Após as incubações com os anticorpos e as marcações com os corantes, as lamínulas foram montadas sobre lâminas histológicas com $10 \mu\text{L}$ de solução protetora de fluorescência (anti-fading-Vectashield Burlingame, CA, Estados Unidos da América). As imagens foram adquiridas com o auxílio do microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510 – ZEISS).

Não foram realizadas imunofluorescências utilizando as preparações com os esferoides fixados, mas sim colorações dos microfilamentos de actina e do DNA. Algumas

alterações no protocolo foram feitas para as colorações utilizando os esferoides. Os esferoides foram cultivados como descrito acima e após 7 e 14 dias foram processados para realização das colorações. Os esferoides foram transferidos das placas para tubos de 15 mL para a sedimentação. O meio de cultura foi retirado e adicionado PBSA. Os esferoides foram lavados três vezes em PBSA. Após a lavagem com PBSA, os esferoides foram fixados em formaldeído 3,7% por 30 minutos. A cada 10 minutos os esferoides eram ressuspensos para propiciar que a fixação fosse mais eficiente.

Após a fixação, os esferoides foram novamente lavados três vezes em PBSA e transferidos para tubos de 1,5 mL siliconizados e tratados com Triton X-100 (0,5% em PBSA) por 30 minutos, sendo ressuspensos a cada 10 minutos. Após nova lavagem com PBSA, os esferoides foram tratados com solução de RNAase (10 mg/mL) por 1 hora e novamente lavados com PBSA. Após retirar o PBSA, foi adicionado 30 µL de faloidina conjugada a FITC (Sigma), na concentração de 7,5 µM em PBSA, permanecendo em contato com os esferoides por 4 horas. A seguir, os esferoides foram novamente lavados com PBSA e foi adicionado ao tubo de 10 µL Vecta-shield com 5 µL de iodeto de propídeo (10 µg/mL).

A solução de iodeto de propídeo, *vecta shield* e esferoides foram transferidos para lâminas histológicas e lamínulas foram colocadas sobre essas lâminas e seladas. A fim de evitar o achatamento dos esferoides foram colocados quatro pontos de esmalte de unha nas extremidades das lâminas antes de colocar as lamínulas sobre o material, aumentando assim a altura entre a lâmina e a lamínula. As imagens foram adquiridas com o auxílio do microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510 – ZEISS).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos experimentos de imunofluorescência.

Anticorpo/Empresa/Breve Descrição	Concentração utilizada
Anti-EGFR policlonal (coelho) / Santa Cruz Biotechnology EGFR (1005) sc-03 - Marca o EGFR total	1:20
p-EGFR monoclonal (coelho) / Abcam EGFR (phospho Y1068) ab40815 - Marca os resíduos ao redor da tirosina 1068 do EGFR	1:250
E-caderina policlonal (coelho) / Santa Cruz Biotechnology E-cadherin (H-108) sc-7870 - Marca o domínio extracelular da E-caderina	1:50
Anti-Golgina (camundongo) / Molecular Probes Anti-Human Golgin (A-21270) - Marca a proteína golgin-97, proteína de membrana localizada na região citoplasmática do complexo de Golgi.	1:50
Anti-IgG (camundongo) conjugado a FITC (Sigma F9137) - Anticorpo secundário necessário para evidenciar por fluorescência a proteína alvo (anticorpo primário)	1:200
Anti-IgG (coelho) conjugado a TRITC (Sigma F6778) - Anticorpo secundário necessário para evidenciar por fluorescência a proteína alvo (anticorpo primário)	1:200

3.6 MEDIDA DA ÁREA DOS ESFEROIDES

A área de uma secção mediana dos esferoides foi medida por meio das ferramentas do software Zeiss LSM Image Browser. As imagens das preparações dos esferoides de 14 dias, coradas como descrito no item acima, foram adquiridas ao microscópio confocal de varredura a laser e fundidas. Cada esferoide foi contornado com um traçado e desta forma o software calculou a área e o perímetro dessas estruturas. Foram realizados três experimentos independentes.

3.7 WESTERN BLOTTING

As células cultivadas em monocamada foram lavadas três vezes com PBSA e depois lisadas em tampão RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1,0%, ácido deoxicolato de sódio 0,5% em Tris 50 mM-HCl, pH=7,5) contendo uma mistura com inibidores de proteases e fosfatases (NaF e ortovanadato) (Sigma-Aldrich). Para a extração das proteínas dos esferoides, eles foram transferidos das placas para tubos de 15 mL e submetidos a centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos. O meio foi retirado e foi adicionado 1 mL de PBSA e os tubos foram então submetidos novamente à centrifugação. O procedimento de lavagem com PBSA foi repetido por 3 vezes. Então o PBSA foi retirado e os esferoides foram lisados também em tampão RIPA. Os esferoides foram misturados ao tampão RIPA com auxílio de uma pipeta, até verificar a completa dissociação de suas células. Os lisados então foram transferidos a tubos de 2 mL de fundo cônico (*Eppendorf*). Os lisados provenientes de ambos os tipos de culturas celulares foram homogeneizados por ultrassom (2 segundos a uma amplitude de 20%) e, em seguida, centrifugados a 12000 G por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo para quantificação das proteínas.

As proteínas foram quantificadas através do método de BCA (Pierce Inc Rockford, IL, USA). A leitura da absorbância foi realizada por espectrofotômetro utilizando o filtro de 595 nm. Em seguida, foram diluídas em tampão de amostra contendo 3% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150 mM Tris pH 6.8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol e fervidas por 5 minutos. Foram carregados 30 µg de proteína por poço de um gel de poliacrilamida 10% (preparado com 1,5M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida,

10% de persulfato de amônia e TEMED). Foi realizada eletroforese seguindo o método SDS-PAGE. O padrão de peso molecular utilizado foi o Precision Plus Standards-Dual Color Bio-Rad.

Após a separação, as proteínas foram transferidas (100 V, 250 mA por 2 horas) para membrana de PVDF (Amersham Bioscience). Após a transferência as proteínas da membrana foram coradas com solução de Ponceau 0,5% por 3 minutos para verificar a eficiência da transferência. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes em TBS (0,02 M) por 10 minutos.

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em TBS-tween (TTBS) por 1 hora. As membranas contendo proteínas fosforiladas foram bloqueadas em 5% de soro albumina bovina (BSA), diluído em TTBS por 30 minutos, com inibidores de fosfatase e o bloqueio foi seguido de duas lavagens com TTBS.

As membranas foram incubadas com os anticorpos, descritos na tabela 2, diluídos em solução de bloqueio, por 12 horas a 4 °C sob agitação. No caso das membranas contendo proteínas fosforiladas, a incubação dos anticorpos foi em TTBS. Após 4 lavagens intercaladas com TBS e TTBS de 10 minutos cada, a membrana foi incubada com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (1:1000) (Kit ECL, Amersham GE), lavada novamente e revelada por quimioluminescência (ECL, Amersham GE) conforme especificações do fabricante. Os resultados obtidos foram registrados em filme radiográfico Hyperfilm (Amersham GE). A análise densitométrica das bandas foi realizada pelo programa ImageJ. Foram realizados três experimentos independentes.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados nos experimentos de *Western blotting*.

Anticorpo/Empresa/Breve Descrição	Concentração utilizada
Anti-EGFR policlonal (coelho) / Santa Cruz Biotechnology EGFR (1005) sc-03 - Marca o EGFR total	1:300
p-EGFR monoclonal (coelho) / Abcam EGFR (phospho Y1068) ab40815 - Marca os resíduos ao redor da tirosina 1068 do EGFR	1:1000
E-caderina (coelho) / Santa Cruz Biotechnology E-cadherin (H-108) sc-7870 - Marca a E-caderina	1:200
Vimentina (camundongo) / Sigma Anti-Vimentina (V6630) - marca a vimentina	1:1000
Citoqueratina-18 (camundongo) / Sigma Anti-Cytoqueratin peptide 18 (C8541) - marca a citoqueratina no pepitídeo 18	1:500
Tubulina (coelho) / Sigma Anti- γ -Tubulina (T5192) - marca a tubulina	1:500
Actina (camundongo) / Sigma Anti- β -Actina (A2228) - marca a actina	1:2000
p-ERK (camundongo) / Santa Cruz Biotechnology (sc 7383) - marca uma sequência de aminoácidos contendo a tirosina fosforilada Tyr 204 de ERK 1.	1:500
ERK 1 (coelho) / Santa Cruz Biotechnology (sc 93) - marca a região C-terminal de ERK 1.	1:2000
p-Akt 1,2,3 (coelho) / Santa Cruz Biotechnology (sc 7985-R) - marca Ser 473 fosforilada de Akt1, Ser 474 fosforilada de Akt2 e a Ser 472 de Akt3.	1:300
Akt 1,2,3 (coelho) / Santa Cruz Biotechnology (sc 8312) - marca a Akt 1, 2 e 3.	1:400

3.8 RT-PCR

A extração de RNA das linhagens estudadas foi feita com ChargeSwitch Total RNA Cell Kits. O RNA foi quantificado utilizando o aparelho NanoDrop ND1000 Spectrophotometer. Os níveis de expressão foram determinados por reações de RT-PCR em tempo real em um aparelho da Corbett Research modelo Rotor Gene 6000 real-time cycler, o kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Ambion) e Sybr-Green (Invitrogen). As condições dos qRT-PCR foram 45 °C por 10 min; 95 °C por 15 min, 40 ciclos [95 °C por 15 seg; 52 °C por 20 seg; 72 °C por 30 seg], seguindo então o melt. Os primers usados foram: qEGFR_Right TCCTTTGGGGCATAGATCAG e qEGFR_Left GCTGACCTGGAGGGAACATA (Tm 52 °C), qVim_Right TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT e qVim_Left GAGAACTTTGCCGTTGAAGC (Tm 55 °C), qCyto18_Right GAGCTGCTCCATCTGTAGGG e qCyto18_Left CACAGTCTGCTGAGGTTGGA (Tm 55 °C), qEcad_Right AAAGTGATGACCTCCCATGC e qEcad_Left TACCTGCTCACGTCAAATGC (Tm 55 °C). A normalização foi feita pelo RNA total (BUSTIN, 2000, 2002). Foram realizados três experimentos independentes.

3.9 TRATAMENTOS E ANÁLISE DO NÚMERO DE CÉLULAS

As células foram plaqueadas sobre lamínulas em placa de Petri de 35 mm, com inóculo inicial de 2×10^4 células em 2 mL de meio DMEM suplementado com 2,5% SFB. Após 24 horas foram trocados o meio de todas as placas com quantidades variadas de SFB (10% SFB ou 2,5% SFB) e adição de EGF (100 ng/mL; 200 ng/mL) ou AG1478 (5 μ M). Os grupos experimentais foram: células controle (10% de soro fetal bovino - C 10% SFB), células contendo meio com 2,5% de soro fetal bovino (C 2,5% SFB), células com meio contendo 2,5% SFB com EGF (2,5% SFB + EGF); células com meio contendo 2,5% SFB com AG1478 (2,5% SFB + AG1478) e células com meio 2,5% SFB com AG1478 e EGF (2,5% SFB + AG1478 + EGF). Nesse último grupo, primeiramente as células foram tratadas por 1 hora com AG1478 e depois foi adicionado EGF. As células permaneceram nessas condições por 24, 48 e 72 horas para a contagem do número de células. Os demais experimentos foram realizados após 48 horas de tratamento. Após os períodos determinados de cultivo, as células foram lavadas

três vezes com 500 mL de PBSA e foi adicionado 500 mL de tripsina. A tripsina foi inativada com 500 mL de meio de cultura contendo 10% SFB e a quantidade de células de cada grupo foi analisada por citometria de fluxo (Guava, GE Healthcare). Cinco mil células de cada grupo foram quantificadas e foi calculada a quantidade de células por 1 mL presente em cada placa. O número de células dos esferoides também foi quantificado, como já descrito no item da curva de crescimento, ver 3.3. Foram realizados três experimentos independentes.

3.10 CICLO CELULAR

As células, cultivadas em monocamada, foram plaqueadas em uma densidade de 2×10^4 , sendo submetidas aos tratamentos. Após determinados períodos a suspensão de células foi obtida por digestão enzimática com tripsina/ EDTA e transferida para tubo de 15 mL com fundo cônico. As células foram centrifugadas por 8 minutos a 1000 rpm.

As amostras foram lavadas em PBSA e fixadas em metanol gelado por pelo menos 1 hora a 4 °C. Após esse período as células foram novamente submetidas a centrifugação por 8 minutos a 1000 rpm sendo lavadas em 1 mL de PBSA e submetidas novamente a centrifugação. As células foram coradas por 1 hora (PBSA, 3 mg/mL RNAase e 30 µg/mL de iodeto de propídeo). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava, GE Healthcare).

Os esferoides foram transferidos para tubos de 15 mL com fundo cônico e também centrifugados por 8 minutos a 1000 rpm. Os esferoides foram lavados com PBSA, submetidos à centrifugação novamente. Foi adicionado 1 mL de tripsina e os tubos foram colocados a 37 °C. Os esferoides foram misturados com a tripsina com auxílio de uma pipeta a cada 5 minutos. As células dissociadas foram então centrifugadas e o protocolo prosseguiu como o descrito para as células cultivadas em monocamada. Foram realizados três experimentos independentes.

3.11 ÍNDICE MITÓTICO

As células foram plaqueadas sobre lamínulas em placa de Petri de 35 mm, com inóculo inicial de 2×10^4 células, sendo submetidas aos tratamentos. As células foram fixadas, utilizando-se os mesmos procedimentos citados na imunofluorescência. Os núcleos foram então contracorados com iodeto de propídeo ($10 \mu\text{g/mL}$, Sigma) por 15 minutos e as lamínulas foram montadas sobre lâminas histológicas com “*anti-fading*”, Vecta-shield (Vector, Burlingame, CA, USA). Foram quantificadas as metáfases presente nas preparações com auxílio de um microscópio de fluorescência, contando-se um total de 2000 células por placa. Foram realizados três experimentos independentes.

3.12 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

As células foram plaqueadas sobre lamínulas em placa de Petri de 35 mm, com inóculo inicial de 1×10^3 células em meio DMEM suplementado com 10% SFB e, após 24 horas, o meio foi trocado. As células controle receberam meio somente com 10% SFB e nas tratadas foi adicionada ao meio a droga AG1478, na concentração de $5 \mu\text{M}$. Foi realizado um grupo contendo DMSO, sendo controle, pois AG1478 é diluído nessa substância. Após 48 horas nessa condição, as células foram lavadas três vezes em PBSA e foi adicionado tripsina. As células foram então centrifugadas a 1000 rpm por 8 minutos e depois foram ressuspendidas em $50 \mu\text{L}$ de meio de cultura. Foi adicionado $450 \mu\text{L}$ de reagente Via Count (GUAVA Technologies) para determinação da viabilidade celular e após 10 minutos as células foram analisadas em citômetro de fluxo (GUAVA Easy Cyte mini). Foram realizados três experimentos independentes.

3.13 ENSAIO DE FERIDA

As linhagens celulares foram cultivadas (1×10^5 células/placa de 35 mm) por 24 horas a 37 °C. Após 24, foi realizada uma “ferida” na monocamada, através de delicada passagem de uma ponteira de 10 µL sobre a mesma. Assim uma descontinuidade foi formada na monocamada, cujas células em sua margem tenderão a migrar para os espaços vazios. Depois de realizadas as “feridas”, foi adicionado ao meio de cultura DMEM, com adição de 2,5% SFB ou 10% SFB), os tratamentos de cada grupo experimental: 100 ng/mL de EGF, 5 µM de AG1478, 30 µM de LY294002, 10 µM de U0126 ou sem acréscimo de nenhuma substância (grupo controle). Pontos de referência foram demarcados no fundo de cada placa, a fim de permitir obtenção de fotomicrografias das mesmas regiões das “feridas” em diferentes tempos (0, 24 e 48 horas). As imagens foram obtidas por meio do microscópio de luz invertido digital EVOS AME-3302 (Aeleusden, Holanda) e foram analisadas com o auxílio do programa qCMA (ZEISEL et al., 2012). O decréscimo percentual da área da “ferida” caracterizou o índice de migração celular. Foram realizados três experimentos independentes.

O ensaio de migração realizado para os esferoides consistiu na análise da migração das células da periferia dos esferoides (Figura 8) pelo método de migração de esferoide (*Spheroid Migration Assay*) (KRAMER et al., 2013). Os esferoides foram cultivados por 13 dias e foram transferidos a placas de 35 mm com tratamento para a adesão celular, mantidos em estufa por 24 horas e sem rotação. Os esferoides com 13 dias de cultivo são visíveis sem a necessidade de um microscópio e, desta forma, foram transferidos aproximadamente 10 esferoides por placa. Os esferoides aderiram às placas e as células de sua periferia começaram a migrar de forma centrífuga para fora das esferas. O diâmetro da área total de 5 esferoides de cada grupo experimental foi medido no início do experimento. Após 24 horas o diâmetro foi novamente medido, levando em conta as células mais distantes da região central dos esferoides. Foi realizada a subtração da medida do diâmetro após 24 horas da medida do diâmetro no início do experimento. Assim obtivemos a distância percorrida pelas células a partir dos esferoides. As imagens foram obtidas por meio do microscópio de luz invertido digital EVOS AME-3302 (Aeleusden, Holanda) e analisadas pelo software Axio Vision LE64. Foram realizados três experimentos independentes.

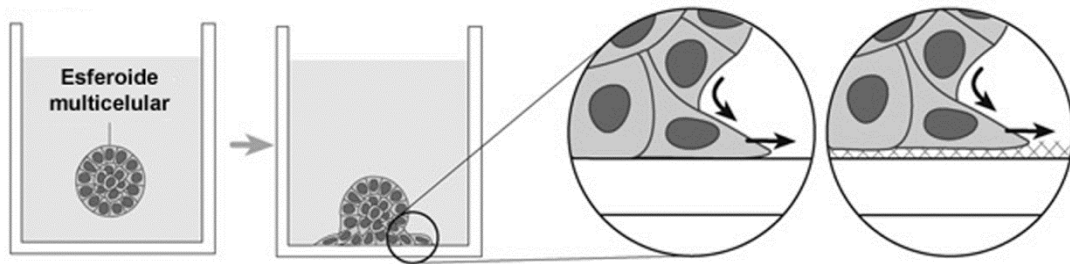


Figura 8 - Esquema mostrando como o método de migração de esferoide (*Spheroid migration assay*) é realizado. Fonte: Modificado de Kramer et al. (2013).

3.14 MICROSCOPIA EM TEMPO REAL (*TIME LAPSE*)

As células foram cultivadas (5×10^4 células por placa) em placa com fundo de vidro com quatro compartimentos diferentes. Após 24 horas, foi adicionado a cada compartimento um dos tratamentos a seguir: meio de cultura com 2,5% SFB + 100 ng/mL EGF, meio de cultura com 2,5% SFB + 5 μ M AG1478, meio de cultura com 2,5% SFB e meio de cultura com 10% SFB. As células foram observadas por 12 horas ao microscópio *Biostation* (Nikon), com manutenção da temperatura a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂. As imagens foram tiradas a cada 15 minutos usando uma objetiva com aumento de 20 X. As rotas das células em intérfase foram traçadas nas imagens adquiridas pelo *plugin* MTrackJ do software Image J, tendo a posição do núcleo como referencial. A velocidade de 30 células de cada grupo foi calculada por meio da divisão do espaço percorrido por cada célula dividido pelo tempo total de análise.

3.15 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Após a retirada do meio de cultura, os esferoides foram lavados com uma solução de tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e fixados com a solução de glutaraldeído 2,5% com formaldeído 2%. Após 2 horas a temperatura ambiente, o fixador foi retirado e o material passou por 3 banhos de 5 minutos em tampão cacodilato de sódio. Após este processo iniciou-se a pós-fixação com uma solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio. Os esferoides foram lavados em água destilada e seguiram para uma gradual desidratação etílica de 15 minutos em cada banho (50, 70, 80, 90 e 2 x 100% etanol).

Na etapa final da desidratação o material ficou imerso em óxido de propileno durante 10 minutos (2 banhos de 5 minutos), seguindo para um banho de uma mistura de resina Epon® (Electron Microscopy Science, PA, Estados Unidos da América) mais óxido de propileno (1:1) durante 5 horas. A mistura foi substituída por resina Epon® pura, permanecendo as células nesta solução por mais 5 horas. A inclusão das células foi feita em formas de silicone preenchidas com a mesma resina, sendo esta polimerizada após 72 horas em estufa a 65 °C.

Após o desbaste dos blocos de resina, foram feitos cortes em ultramicrotomo com espessura de 7 µm, sendo estes montados em lâmina de vidro, corados com azul de toluidina e visualizados ao microscópio de luz. Escolhida a região de interesse no bloco, foram feitos cortes na espessura de 70 a 90 nm, sendo posteriormente colocados em telas de cobre (200 *mesh*). O material foi contrastado em uma solução de acetato de uranila a 4% por 30 minutos, posteriormente lavados em água e colocados em uma solução de citrato de chumbo a 10%. Após serem novamente lavados, retirou-se o excesso de água destilada e as telas de cobre foram acondicionadas em um porta-telas e mantidas em ambiente resfriado. O material foi analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol® (Queensland, Brisbane, Austrália) 1010 (80 kV).

3.16 INCORPORAÇÃO POR BRDU

A detecção da fase S foi realizada pela incorporação de BrdU, utilizando o kit BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit Staining Protocol. Os esferoides foram cultivados por 14 dias e o foi adicionado ao meio de cultura 10 µL de BrdU (1 nM) por 1 hora. Após esse período, o meio foi retirado, os esferoides foram lavados com PBSA e tratados com tripsina para a dissociação das células. O número de células foi contado e 50 µL de *staining buffer* foi adicionado a 10^6 células.

As células foram fixadas e permeabilizadas com 100 µL *BD Cytofix / Cytoperm Buffer*, por 30 minutos a temperatura ambiente. Após essa fixação as células foram lavadas com 1 mL de tampão 1 X *BD Perm/Wash*, centrifugadas por 5 minutos a 300 G e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 100 µL *BD Cytoperm Plus Buffer*, para permeabilizar as células, por 10 minutos no gelo. As células foram novamente lavadas com 1 mL de tampão 1 X *BD Perm/Wash*, centrifugadas por 5 minutos a 300 G e o sobrenadante foi descartado.

As células foram ressuspensas em 100 µL *BD Cytofix / Cytoperm Buffer*, incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, para uma nova fixação. As células foram lavadas com 1 mL de tampão 1 X *BD Perm/Wash*, centrifugadas por 5 minutos a 300 G e o sobrenadante foi descartado.

As células foram ressuspensas com 100 µL de DNase (30 µg de DNase por tubo) e incubadas por 1 hora a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas com 1 mL de tampão 1X *BD Perm/Wash*, centrifugadas por 5 minutos a 300 G e o sobrenadante foi descartado. As células foram então ressuspensas em 50 µL de tampão 1 X *BD Perm/Wash* contendo anticorpo anti-BrdU com fluorocromo conjugado, sendo incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas com 1 mL de tampão 1 X *BD Perm/Wash*, centrifugadas por 5 minutos a 300 G e o sobrenadante foi descartado.

A última etapa consistiu na adição de 20 µL de 7-AAD, para coloração do DNA. As células foram ressuspensas em 1 mL de tampão *staining buffer* e as células foram analisadas por citometria de fluxo. Foram realizados três experimentos independentes.

3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística realizada com os dados obtidos com a monocamada foi realizada usando o programa Minitab 15. Os testes para determinar as diferenças entre os controles e os tratamentos foram *one-way ANOVA*, *two-way ANOVA (multiple comparisons by Tukey)* e Test t de Student. As diferenças foram consideradas significantes a $p \leq 0,05$.

Devido ao número limitado e pequeno de réplicas nos experimentos com os esferoides, utilizaram-se testes não paramétricos para identificar a existência de diferenças entre os tratamentos de cada experimento. O teste baseado em ranqueamento de Kruskal-Wallis (com correções para múltiplas comparações quando necessário) foi utilizado para analisar os resultados obtidos para cada um dos experimentos. Este teste é similar ao Teste t de Student e Análise de Variância (ANOVA - com testes a posteriori de Tukey), porém não possui as premissas desses dois testes paramétricos (normalidade dos dados e homocedasticidade), o que o torna adequado para casos de baixo número amostral onde essas premissas falham em ser verificadas. Para os experimentos de curvas de crescimento foram construídos modelos lineares para testar a existência de uma tendência temporal no crescimento. Por fim, para os experimentos de migração celular realizado com os esferoides (*Sphere Migration Assay*), após verificação de normalidade e homocedasticidade dos dados, utilizamos Análise de Variância (ANOVA) com testes a posteriori de Tukey para identificar qual dos tratamentos apresentou diferenças significativas em relação aos outros. Todos os testes foram feitos utilizando o ambiente de programação R e o pacote *pgirmess*.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA ATIVAÇÃO DO EGFR EM CÉLULAS CULTIVADAS EM MONOCAMADA

4.1.1 CURVA DE CRESCIMENTO

As células das linhagens A549 e HK2 foram isoladas de carcinoma de pulmão humano, sendo classificadas como células não pequenas de câncer de pulmão. A linhagem HK2, no entanto, foi estabelecida a partir de um fragmento de tumor, diagnosticada como adenocarcinoma pelo grupo do laboratório. As duas linhagens apresentam características de células epiteliais em cultura, formando grupos de células justapostas. (Figura 9 A).

As curvas de crescimento das células A549 e HK2 foram obtidas a partir da contagem do número de células, por um período de 11 dias, partindo de um inóculo inicial comum de 3×10^4 células/placa de 35 mm^2 (Figura 9 B). As células da linhagem A549 proliferaram exponencialmente até o 9º dia em cultura, tendo um decréscimo no número de células após esse período. Nas células da linhagem HK2 o crescimento exponencial da população se manteve até o fim do período analisado (11 dias).

A densidade inicial de células para realização dos experimentos e o tempo para os tratamentos foram baseados nos resultados apresentados na curva de crescimento. Os experimentos foram realizados utilizando-se os períodos de tempo em que ambas as linhagens celulares apresentaram crescimento, entre o 1º e 9º dia.

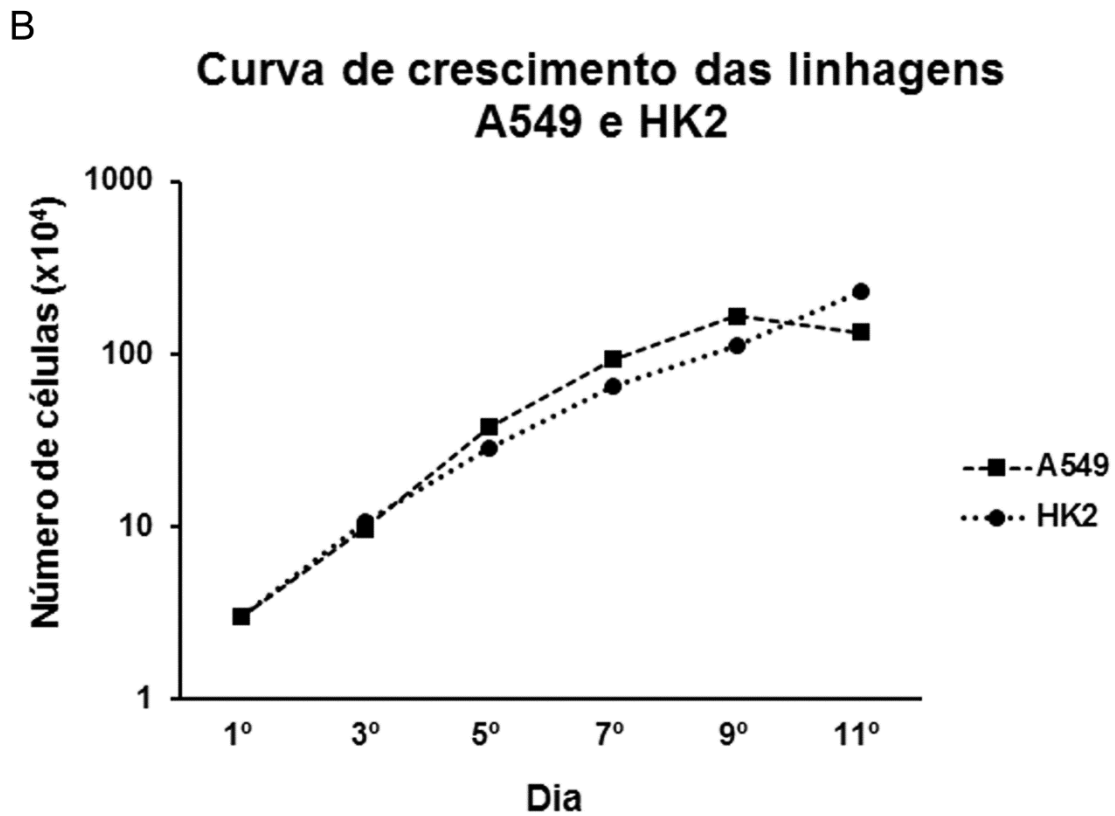
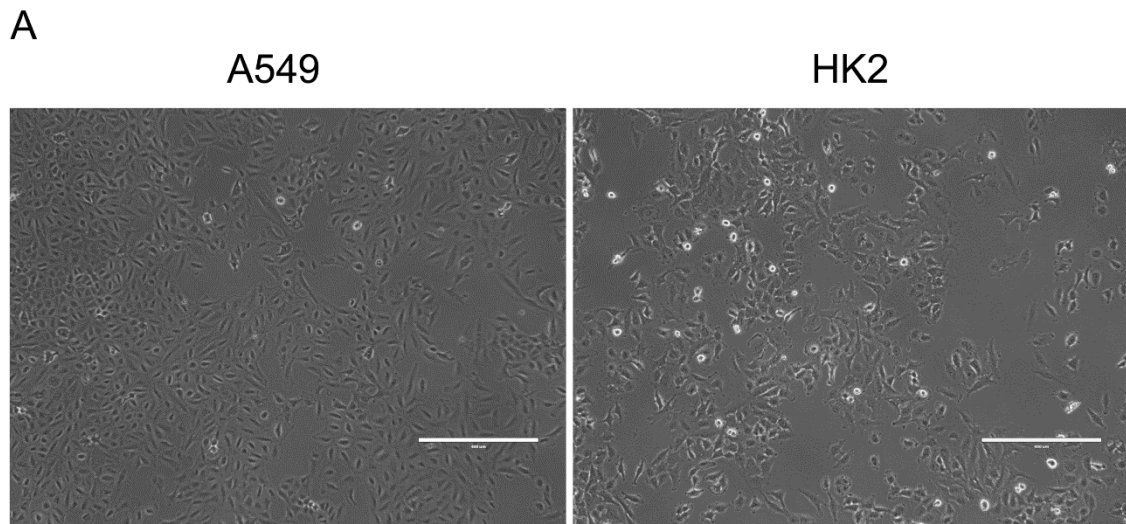


Figura 9 - Morfologia e crescimento das células não pequenas de câncer de pulmão, A549 e HK2. **A** - Células A549 e HK2 cultivadas em monocamada vistas ao microscópio de luz com contraste de fase. A barra equivale a 400 μm . **B** - Gráfico mostrando o crescimento das células A549 e HK2, a partir do inóculo inicial de 3×10^4 células, no decorrer de 11 dias.

4.1.2 NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE ERBB1 E EXPRESSÃO DE EGFR NAS LINHAGENS A549 E HK2

A determinação do número de cópias do gene ErbB1 foi realizada a partir da análise de hibridizações fluorescentes *in situ* utilizando-se, para isso, uma mistura de duas sondas com homologia para o gene de interesse (ErbB1) e o centrômero. A sonda marca o ErbB1 e o centrômero do cromossomo 7, localizado próximo ao gene. Ambas as marcações, para o gene de interesse e para o centrômero, foram quantificadas nos núcleos de 100 células de cada linhagem. A maioria das células da linhagem A549 apresentaram 3 cópias do gene ErbB1, bem como 3 marcações para o centrômero do cromossomo 7 (Figura 10). As células da linhagem HK2 continham maior número de cópias do gene quando comparadas com a A549 (Figura 10 A). Esse número variou de 4 a 9 cópias por núcleo nas células HK2, com a maioria das células contendo 5 ou 6 cópias. A marcação para o centrômero do cromossomo 7 também variou na linhagem HK2, sendo que algumas células apresentaram mais cópias do centrômero 7 em relação ao gene ErbB1 e outras continham mais cópias do gene em relação ao centrômero (Figura 10 B). Desta forma, a linhagem HK2 mostrou-se como uma população celular heterogênea.

Após a avaliação do número de cópias do gene ErbB1 nas duas linhagens celulares, foram realizados testes que tiveram como foco a proteína EGFR, codificada por esse gene. A localização celular do EGFR foi investigada por meio de imunofluorescência (Figura 11 A). Nas células da linhagem A549 detectou-se o EGFR em diferentes regiões: na periferia das células (próximo à membrana celular), disperso pelo citoplasma e formando aglomerados próximos aos núcleos. Contudo, na linhagem HK2, esse receptor foi detectado preferencialmente na periferia das células.

A pequena detecção da marcação para o EGFR no citoplasma das células HK2 talvez fosse decorrente da menor expressão dessa proteína. Assim, a expressão desse receptor foi analisada por *Western blotting*. Os experimentos demonstraram que a linhagem HK2 apresentava expressão de EGFR três vezes menor quando comparada com a linhagem A549 (Figura 11 B e C). A menor expressão de EGFR na linhagem HK2 coincidiu com a redução dos níveis de RNA mensageiro transcritos pelo gene ErbB1 quantificados por qRT-PCR (Figura 11 D). A linhagem A549 possui o triplo da quantidade de RNAm comparando-se com a HK2.

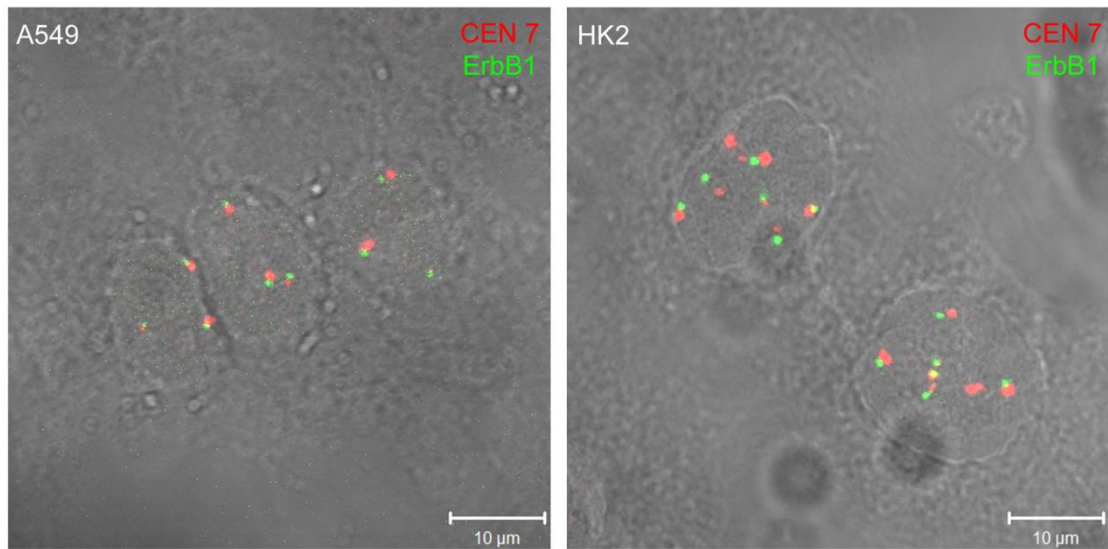
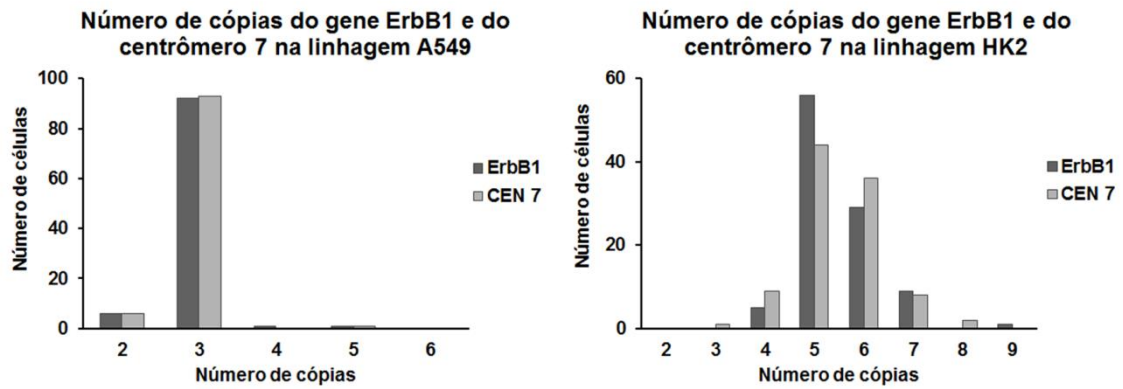
A**B**

Figura 10 - Quantificação do número de cópias do gene ErbB1 nas linhagens A549 e HK2. **A** - Hibridização fluorescente *in situ* mostrando o gene ErbB1 (verde) e o centrômero do cromossomo 7 (vermelho). Os núcleos podem ser visualizados por contraste de interferência (DIC). **B** - Número de cópias do gene ErbB1 e do centrômero 7 por núcleo. Foram analisadas 100 células de cada linhagem.

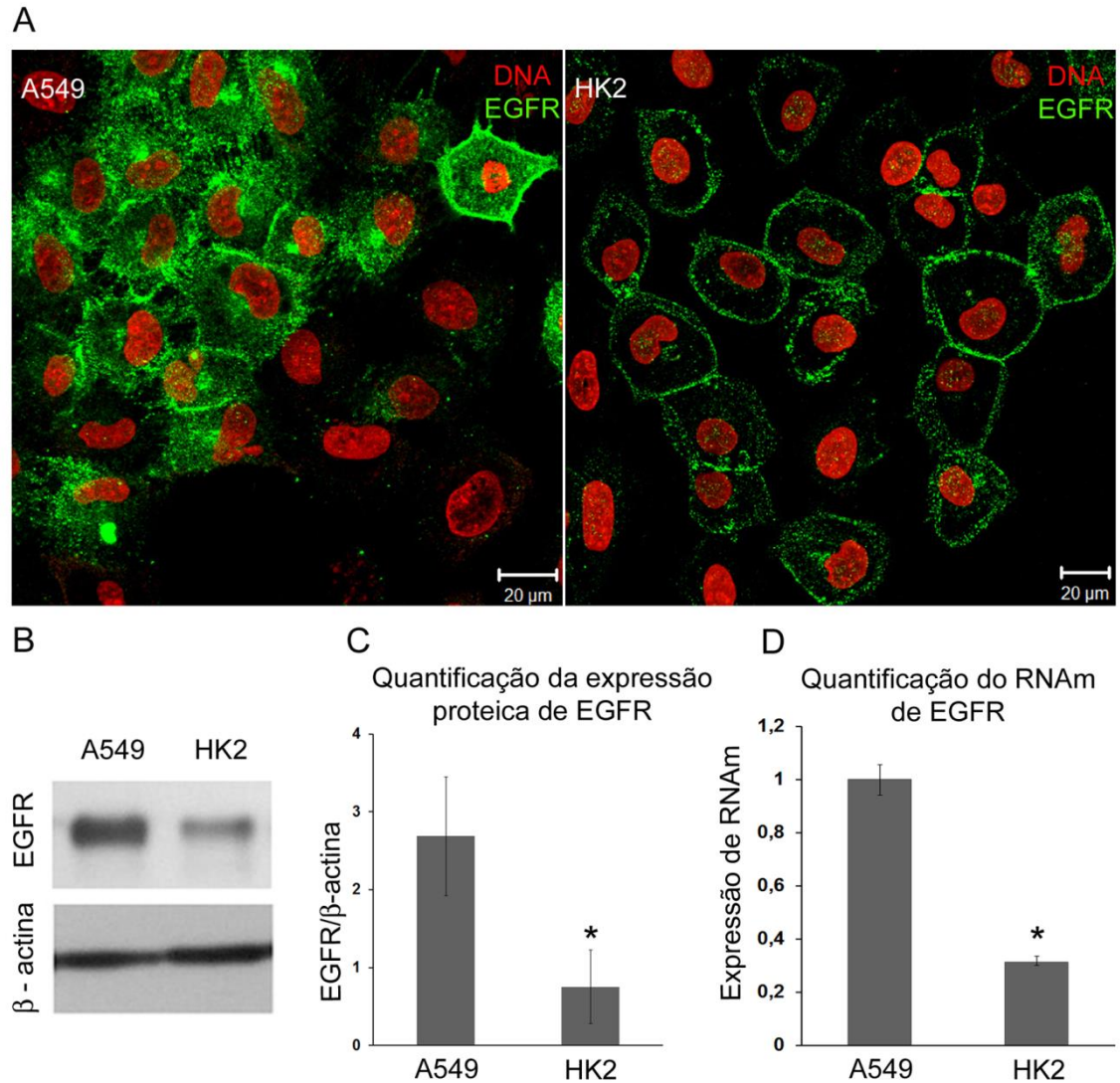


Figura 11 - Localização celular, expressão e níveis de RNAm de EGFR nas células A549 e HK2. **A** - A imunofluorescência foi realizada utilizando-se um anticorpo para o EGFR (verde). O núcleo foi corado com iodeto de propídeo (vermelho). O EGFR está localizado na membrana das células de ambas as linhagens e em aglomerados próximos aos núcleos das células A549. Essa imagem representa uma única secção óptica, foi escolhida uma fatia intermediária das preparações para melhor observação da distribuição do EGFR. **B** - Detecção da expressão dos níveis de EGFR nas linhagens A549 e HK2 por *Western blotting*. **C** - Quantificação da expressão de EGFR utilizando a actina como controle do carregamento do gel. **D** - Gráfico mostrando a detecção dos níveis de RNA mensageiro transcrito pelo gene *ErbB1* pelo método de PCR quantitativo em tempo real. * $P < 0,05$. Barras = desvio padrão.

4.1.3 DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO CELULAR DO EGFR APÓS ATIVAÇÃO COM EGF

Os efeitos da ativação do EGFR foram avaliados pela adição do ligante EGF ao meio de cultura. As células foram estimuladas com 100 ng/mL de EGF por 1 hora, sendo depois fixadas para análise. As células da linhagem A549 exibiram mudanças significantes na distribuição celular do EGFR após estímulo com EGF, em comparação com as células que não foram expostas ao EGF (controle) (Figura 12). O EGFR estava localizado nas bordas das células controle e após estímulo com EGF o receptor foi detectado em pequenos e numerosos aglomerados dispersos no citoplasma, similares a vesículas, e em aglomerados próximos ao núcleo (Figura 12). Na linhagem HK2 as mudanças não foram tão expressivas; após o estímulo foi possível observar o EGFR formando os mesmos aglomerados dispersos pelo citoplasma, mas em menor quantidade que na linhagem A549. A marcação na periferia da célula se manteve presente (Figura 12 e 13 A).

Uma dupla imunomarcação para EGFR e golgina (detecção do Complexo de Golgi) foi realizada. O histograma da Figura 13 B apresenta o perfil (distribuição) do sinal verde (EGFR) e do vermelho (golgina) no citoplasma nos locais selecionados (Figura 13 A), indicando quando os sinais estão colocalizados. Os locais escolhidos para a análise tinham quatro estruturas similares a vesículas, contendo a marcação verde (EGFR). Os sinais de EGFR, observados na linhagem A549, colocalizam com a imunolocalização da golgina nas preparações analisadas (Figura 13 B). As células da linhagem HK2 não apresentaram a mesma colocalização em comparação com a linhagem A549 (Figura 13 B).

A forma fosforilada do EGFR (p-EGFR) foi analisada por imunofluorescência nas células controle e nas estimuladas por 1 hora com EGF. As células A549 controle não apresentaram marcação evidente para o p-EGFR. Entretanto, após a adição de EGF, detectou-se a proteína em estruturas parecidas com vesículas no citoplasma (Figura 14 A). A marcação de p-EGFR é bastante similar à mostrada para o EGFR nas células estimuladas, contendo possíveis vesículas dispersas no citoplasma (Figura 12), sugerindo que algumas vesículas das células estimuladas com EGF contêm p-EGFR. A linhagem HK2 apresentou um padrão diferente, sendo possível detectar a marcação para o receptor fosforilado na periferia das células controle, próximas à membrana. Nas células HK2 estimuladas com EGF

foi possível observar a marcação para p-EGFR em estruturas similares a vesículas no citoplasma, como nas células da linhagem A549 (Figura 14 A).

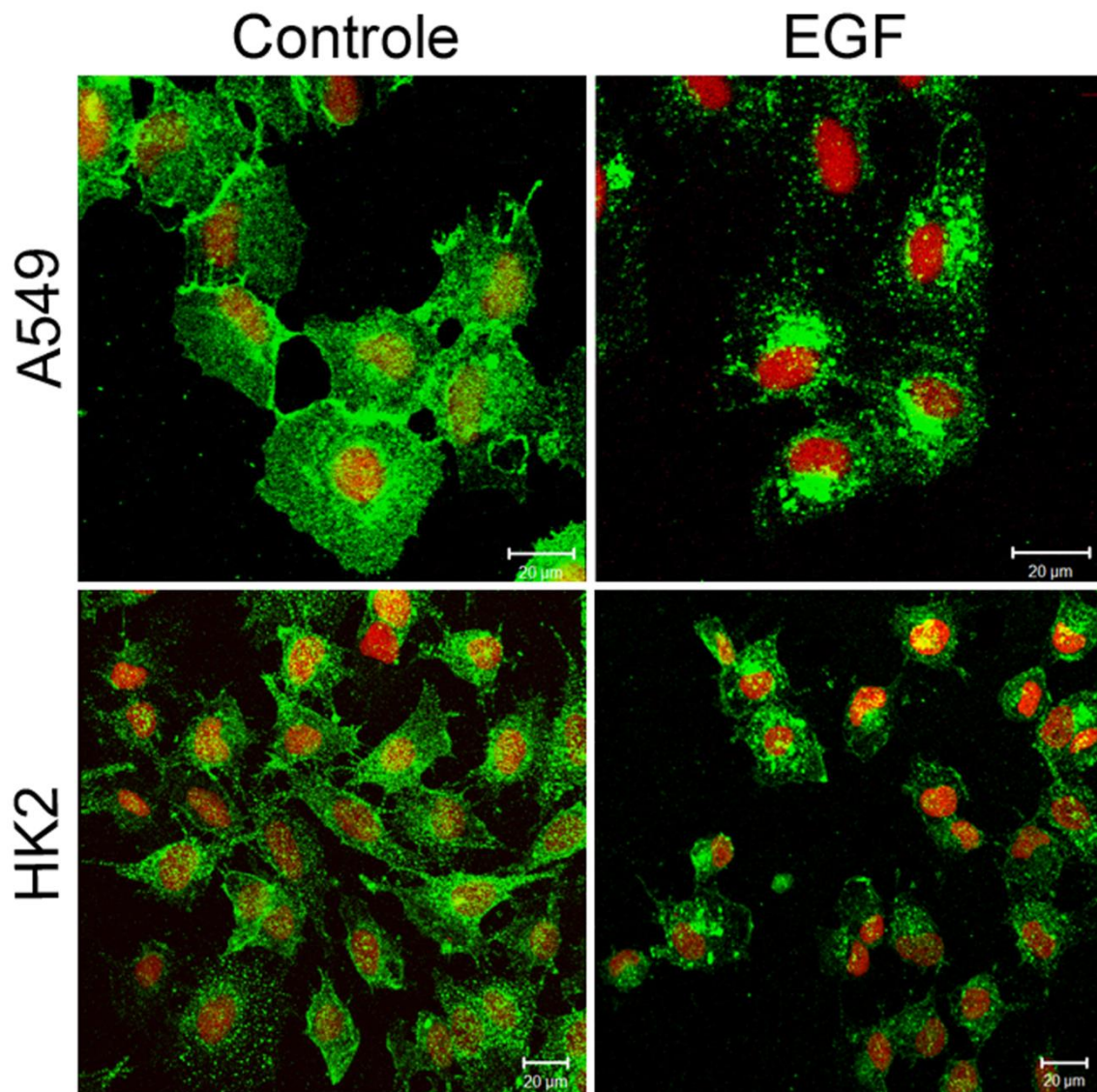


Figura 12 - Detecção da distribuição celular do EGFR nas linhagens A549 e HK2 após estímulo com EGF. As células foram cultivadas em meio contendo 10% SFB (controle) e em meio com 10% SFB suplementado com 100 ng/mL de EGF por 1 hora. O EGFR está representado pela cor verde e os núcleos, corados com iodeto de propídeo, em vermelho. O EGFR foi detectado na membrana celular nas células controle e nas células estimuladas com EGF em pequenos e numerosos aglomerados similares a vesículas, dispersos no citoplasma e em agrupamentos próximos aos núcleos das células. A imagem mostra projeções das secções ópticas adquiridas em um único plano.

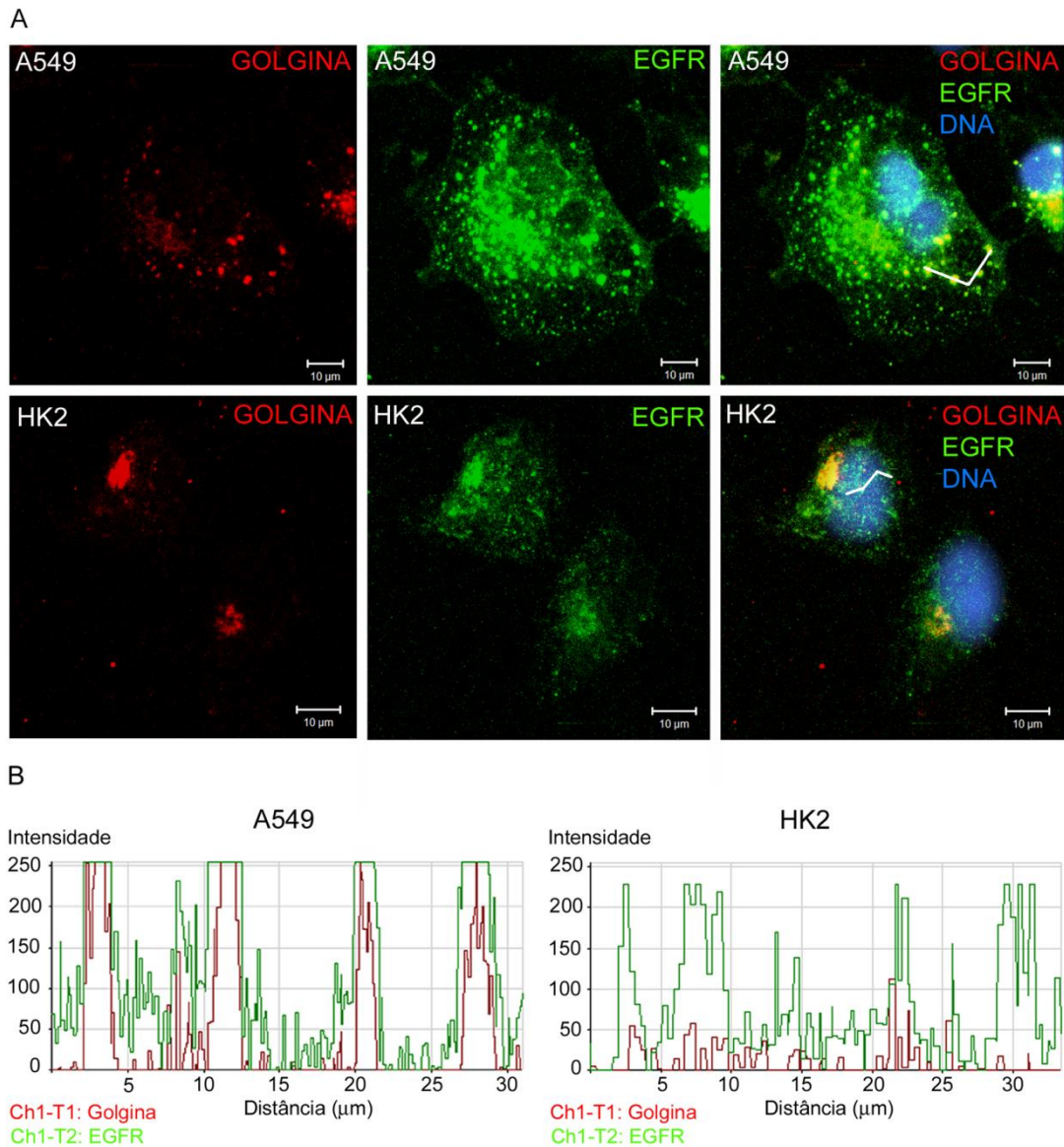


Figura 13 - Distribuição do EGFR em vesículas do Complexo de Golgi após estímulo com EGF. **A** - As células foram estimuladas com EGF (100 ng/mL) por 1 hora. Para a detecção do Complexo de Golgi utilizou-se um anticorpo anti-golgina (vermelho), os núcleos foram corados com DAPI (azul) e o EGFR está representado em verde. Os canais foram separados para visualização individualizada das marcações. O EGFR encontra-se em aglomerados similares a vesículas. A última imagem, que contém todos os canais juntos, possui um traçado sobre 4 possíveis vesículas que foram utilizadas para a análise de colocalização. **B** - Os histogramas foram gerados usando a ferramenta *profile display mode* do software LSM 510 versão 3.2. A colocalização foi examinada ao longo de um traço em um conjunto de imagens combinadas. Algumas estruturas similares a vesículas continham a colocalização da marcação do EGFR com a marcação para o Complexo de Golgi na linhagem A549.

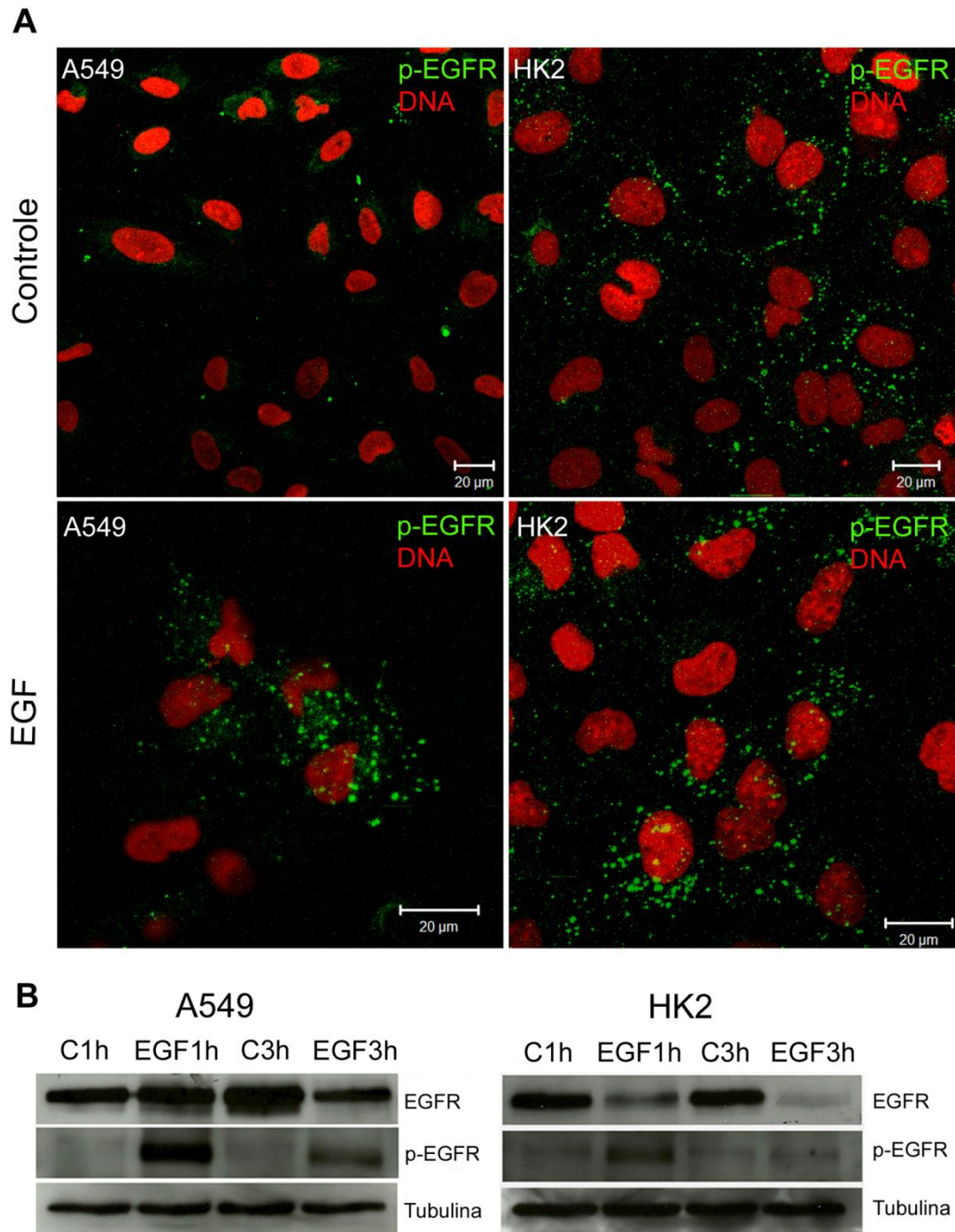


Figura 14 - Localização e expressão de p-EGFR nas linhagens A549 e HK2. **A** - As células foram cultivadas em meio contendo 10% SFB (controle) ou em meio com 10% SFB e suplementado por 100 ng/mL de EGF por 1 hora. A marcação para o p-EGFR está mostrada em verde e os núcleos foram corados com iodeto de propídeo (vermelho). **B** - A detecção do perfil de expressão das proteínas EGFR e p-EGFR foi feita por meio da técnica *Western blotting*. A proteína tubulina foi usada como controle do carregamento do gel. As células foram estimuladas com EGF por 1 hora ou 3 horas (EGF 1 h/EGF 3 h). As células controle foram mantidas em meio sem EGF. A expressão de EGFR no lisado de células controle de A549 e HK2 não pode ser comparada devido a diferentes tempos de exposição do filme.

Os dados em conjunto sugerem que a linhagem A549, após estímulo com EGF, apresenta vesículas contendo p-EGFR, correspondentes à rota de degradação, e vesículas do Golgi contendo EGFR, correspondentes à via de produção do receptor. Já a linhagem HK2, após estímulo com EGF, apresenta o receptor fosforilado dentro de vesículas no citoplasma, que não colocalizam com o Complexo de Golgi, correspondentes à rota de degradação do receptor.

Os níveis totais de expressão de EGFR (intracelular e da superfície celular) e de p-EGFR, antes e após estímulo com EGF, foi detectada pela técnica *Western blotting* (Figura 14 B). Os níveis de EGFR no grupo controle e após estímulo por 1 hora com EGF (EGF 1 h) praticamente não variou na linhagem A549. Após três horas de estímulo (EGF 3 h), a expressão de EGFR diminuiu, comparando-se com as células não estimuladas (controle). A presença de p-EGFR não foi detectada nas células que não foram estimuladas (controle 1 h e 3 h). Entretanto, após 1 hora de estímulo (EGF 1 h), houve a detecção de p-EGFR, e após 3 horas de exposição ao EGF (EGF 3 h), os níveis de p-EGFR diminuíram.

As células da linhagem HK2 mostraram diferentes respostas para o estímulo com EGF. Uma severa redução dos níveis de proteína de EGFR foi verificada depois de 1 hora de estímulo com EGF (EGF 1 h), fato também observado em 3 horas (EGF 3 h). Entretanto, as células controle não estimuladas (C 1 h e C 3 h) apresentaram a expressão de p-EGFR, resultado não verificado na linhagem A549. Os resultados da expressão de p-EGFR nas células controle concordam com o encontrado na imunofluorescência (Figura 14 A). Após estímulo por 1 hora houve a detecção de aumento dos níveis de proteína p-EGFR, porém após 3 horas de estímulo esse aumento não foi mais observado.

Os resultados apresentados indicam diferenças na detecção da expressão de EGFR e p-EGFR após o estímulo com EGF em ambas as linhagens. A partir da análise dos dados obtidos com o *Western blotting* pode-se fazer algumas inferências em relação à síntese proteica. Nas células da linhagem A549, provavelmente a síntese de novas moléculas de EGFR pode estar compensando a degradação do receptor após sua internalização. Isso não foi observado na linhagem HK2.

4.1.4 ATIVAÇÃO DO EGFR PELO LIGANTE EGF NÃO INDUZ PROLIFERAÇÃO CELULAR

Visto que o EGFR é fosforilado pela exposição ao EGF em ambas as linhagens estudadas, o próximo passo foi verificar se a ativação do EGFR poderia contribuir para a proliferação celular. As duas linhagens foram submetidas a privação de soro fetal bovino seguida de adição de EGF. A privação de soro fetal bovino foi realizada para diminuir a quantidade de fatores de crescimento no meio de cultura. O número de células foi determinado depois de 24, 48 e 72 horas. Os grupos experimentais foram: grupo controle (células mantidas sob condições normais de SFB - C10% SFB), grupo controle com carência de soro (células mantidas com 2,5% de SFB - C2,5% SFB) e o grupo com carência de soro e suplementado com EGF (células mantidas com 2,5% de SFB e adição de 100 ng/mL de EGF - 2,5% SFB + EGF).

Não houve diferença significativa no número de células entre os grupos da linhagem A549 nos tempos analisados (Figura 15 A). Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Minitab 15 e houve tendência de diminuição no número de células no grupo estimulado com EGF (2,5% SFB + EGF) após 48 e 72 horas. Resultados semelhantes foram observados na linhagem HK2, também não houve diferença estatística entre os grupos nos tempo 24 e 48 horas. Entretanto, depois de 72 horas, o grupo 2,5% SFB + EGF apresentou menor número de células em comparação com os grupos controle (Figura 15 B).

Como não houve aumento do número de células após estímulo com EGF, o ciclo celular das células foi analisado para verificar possíveis alterações nas fases do ciclo, como por exemplo, parada do ciclo celular. O ciclo celular das células de todos os grupos foi analisado por meio de citometria de fluxo e os resultados estão apresentados na Tabela 3. Os grupos da linhagem A549 estimulados com EGF apresentaram um pequeno aumento na frequência de células na fase G2/M, se comparado com as células controle. O grupo C2,5% SFB apresentou 23,79% das células em G2/M em 48 horas e 21,55% em 72 horas. O grupo estimulado com EGF (2,5% SFB + EGF) apresentou 25,59% das células em G2/M em 48 horas e 24,05% em 72 horas. Foi observado também um decréscimo na população de células em G1; 56,14% das células estimuladas por EGF em 48 horas e 58,79% em 72 horas estavam em G1 comparado com 59,52% e 64,51% das células controle em 48 e 72 horas respectivamente.

Os dados obtidos para a linhagem HK2 indicaram que os grupos estimulados com EGF apresentam uma pequena diminuição da população de células em fases G2/M, comparado com o controle. O grupo 2,5% SFB apresentou 26,78% das células em G2/M em 48 horas e 26,50% em 72 horas. No grupo estimulado com EGF, 23,47% das células estavam em G2/M em 48 horas e 23,06% em 72 horas. Foi observado um aumento consistente na frequência de células em G1 nos grupos estimulados com EGF, correspondendo a 49,58% das células em G1 em 48 horas e 51,03% em 72 horas, comparando com o grupo controle que apresentou 46,40% e 42,60% das células em 48 e 72 horas, respectivamente. Não houve diferenças significativas na fase S dos grupos analisados de ambas as linhagens.

Tabela 3 - Análise do ciclo celular das linhagens A549 e HK2 após estímulo com EGF (100 ng/mL) por 24, 48 e 72 horas.

		24h			48h			72h		
		C10% SFB	C2,5% SFB	2,5% SFB+EGF	C10% SFB	C2,5% SFB	2,5% SFB+EGF	C10% SFB	C2,5% SFB	2,5% SFB+EGF
A549	G1	52,36%	58,63%	51,80%	57,01%	59,52%	56,14%	60,10%	64,51%	58,78%
	S	13,99%	14,87%	15,42%	12,56%	10,68%	9,72%	10,00%	9,44%	8,77%
	G2/M	24,10%	19,60%	22,64%	24,99%	23,79%	25,59%	23,38%	21,55%	24,05%
HK2	G1	41,00%	45,70%	40,94%	43,66%	46,40%	49,58%	46,19%	42,60%	51,03%
	S	24,45%	22,37%	25,82%	22,55%	21,86%	20,74%	21,94%	17,91%	17,26%
	G2/M	30,75%	27,98%	28,78%	29,16%	26,78%	23,47%	27,54%	26,50%	23,06%

Outro experimento foi realizado para verificar se a ausência de proliferação celular, em resposta ao estímulo com EGF, seria atribuída à carência de soro fetal bovino. Ao invés de cultivar as células em meio com 2,5% SFB, as células foram cultivadas na presença de 10% de SFB, condição normal de cultivo. O meio foi então suplementado com 100 ou 200 ng/mL de EGF e o número de células foi quantificado após 48 horas. A adição de EGF no meio com 10% SFB não aumentou a proliferação celular comparando com as células cultivadas somente com 10% SFB (Figura 16). Os dados foram similares aos apresentados na figura 15.

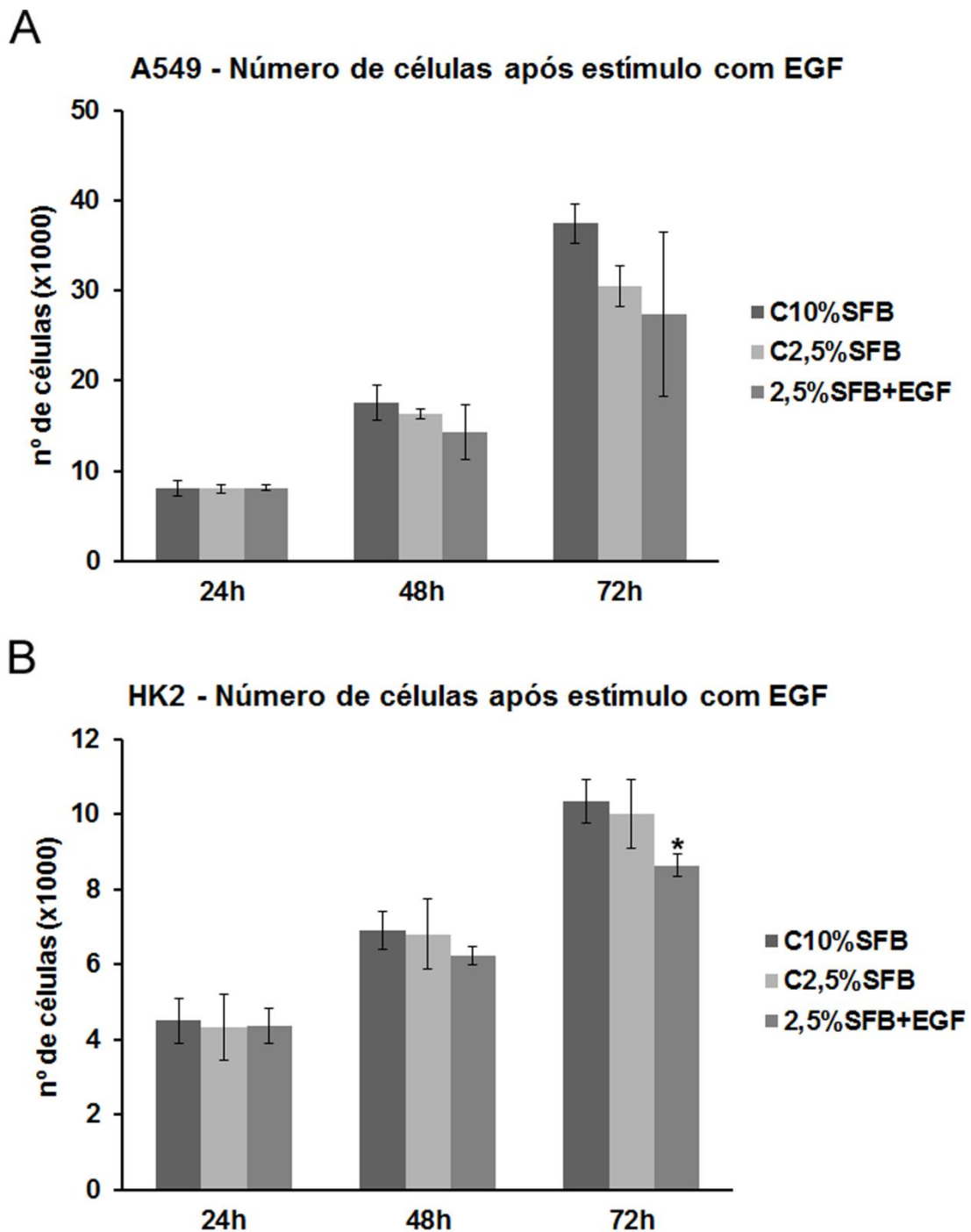


Figura 15 - Determinação do número de células após estímulo com EGF. **A** - Gráfico obtido a partir das análises com a linhagem A549. **B** - Gráfico obtido a partir das análises com a linhagem HK2. Ambas as células foram cultivadas em meio contendo 10% SFB, 2,5% SFB ou 2,5% SFB com adição de EGF (100 ng/mL). O número de células foi contado após 24, 48 e 72 horas a partir da adição de EGF. O eixo y indica o número de células por 1 mL na placa. *P<0,05. Barras = desvio padrão.

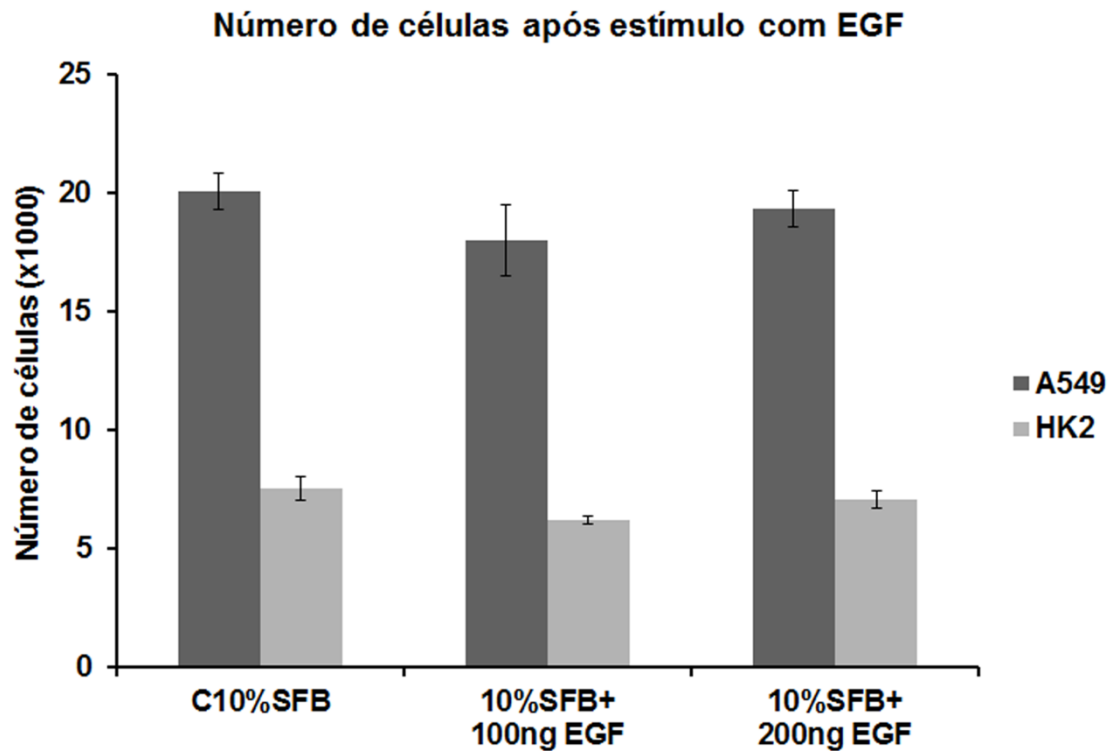


Figura 16 - Determinação do número de células após estímulo com EGF em meio contendo 10% SFB. As células A549 e HK2 foram cultivadas em meio contendo 10% SFB (C10% SFB) suplementado ou não com EGF (100 ng/mL ou 200 ng/mL). O número de células foi quantificado após 48 horas de estímulo. O eixo y indica o número de células por 1 mL na placa. *P<0,05. Barras = desvio padrão.

O ciclo celular das células cultivadas com 10% SFB e estimuladas com EGF por 48 horas também foi analisado e os resultados estão apresentados na Tabela 4 e são similares aos descritos anteriormente. A frequência de células da linhagem A549 na fase G1 foi de 46,81% no C10% SFB, 41,28% em 10% SFB + 100 ng EGF e 42,10% em 10% SFB + 200 ng EGF. Novamente, os grupos estimulados com EGF apresentaram um decréscimo na frequência de células em G1. A frequência de células em G2/M foi de 21,92% no controle, 22,60% no 10% SFB + 100 ng EGF e 23,55% no 10% SFB + 200 ng EGF. Nas células da linhagem HK2, a frequência encontrada para a fase G1 foi 38% das células controle, 44,53% do 10% SFB + 100 ng EGF e 44,2% do 10% SFB + 200 ng EGF, indicando um aumento de células nessa fase depois do estímulo com EGF. A porcentagem de células na fase G2/M foi 26,74% no grupo controle, 26,52% no 100% SFB + 100 ng EGF e 28,39% no grupo 10% SFB + 200 ng EGF. Não houve mudanças significativas na frequência de células em fase S dos grupos analisados.

Tabela 4 - Análise do ciclo celular das linhagens A549 e HK2 após estímulo com EGF (100 ng/mL ou 200 ng/mL) por 48 horas.

		48 horas		
		C10% SFB	10%SFB +100 ngEGF	10%SFB +200 ngEGF
A549	G1	46,81%	41,28%	42,10%
	S	14,70%	14,22%	14,21%
	G2/M	21,92%	22,60%	23,55%
HK2	G1	38,00%	44,53%	44,20%
	S	24,56%	23,69%	21,92%
	G2/M	26,74%	26,52%	28,39%

As metáfases encontradas, após estímulo com EGF, foram quantificadas para obtenção de mais informações sobre a relação do EGF com a proliferação celular. O índice mitótico foi determinado pela quantificação das metáfases de ambas as linhagens (Figura 17). A frequência de metáfases detectadas nos grupos da linhagem A549 foi: 2,9% em C10% SFB, 1,20% em 10% SFB + EGF, 2,05% em C2,5% SFB e 1,35% em 2,5% SFB + EGF. Nas células da linhagem HK2, a frequência de metáfases foi de 1,15% em C10% SFB, 0,35% em 10% SFB + EGF, 1,15% em C2,5% SFB e 0,35% em 2,5% SFB + EGF. Os grupos estimulados com EGF (2,5% SFB + EGF e 10% SFB + EGF), em todas as condições analisadas, apresentaram poucas mitoses comparando-se com os grupos controle (C10% SFB e C2,5% SFB).

Esses dados em conjunto mostram que o estímulo com EGF não foi capaz de promover a proliferação celular, por meio da sinalização mediada pelo EGFR, nas linhagens analisadas.

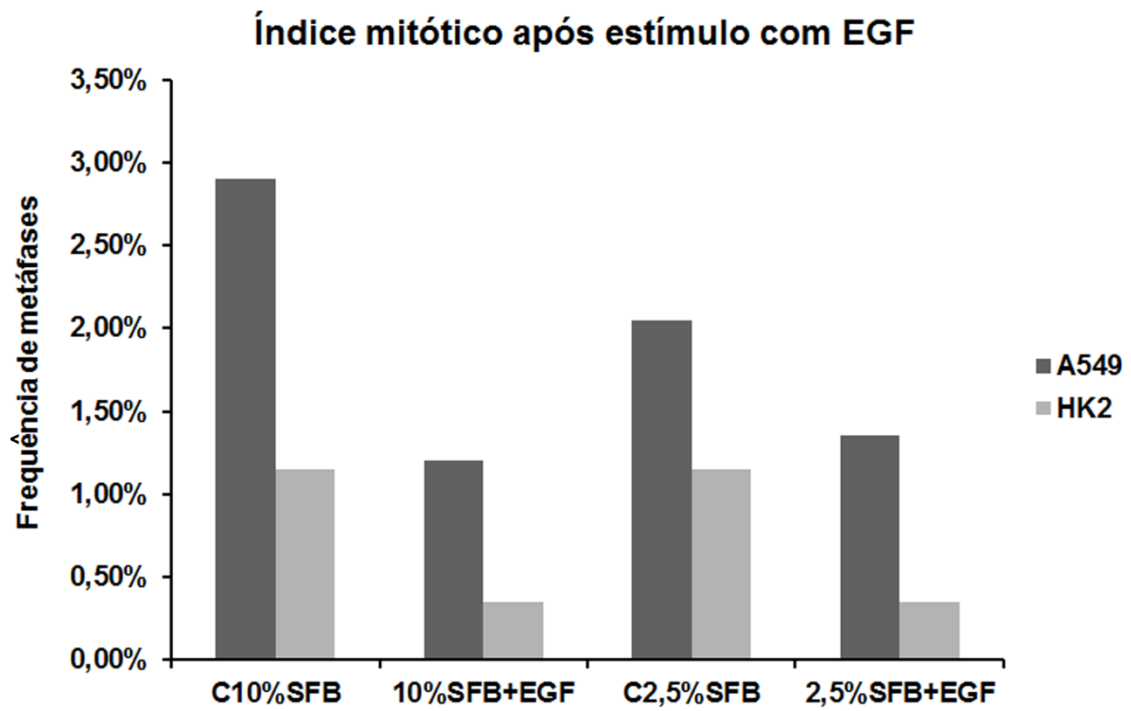


Figura 17 - Quantificação das metáfases após estímulo com EGF. As células das linhagens A549 e HK2 foram fixadas após 48 horas de tratamento (C10% SFB, 10% SFB + 100 ng EGF, C2,5% SFB, 2,5% SFB + 100 ng EGF) e coradas com iodeto de propídeo. As metáfases, encontradas em 2000 células de cada grupo, foram quantificadas.

4.1.5 INIBIDOR DA FOSFORILAÇÃO DO RECEPTOR EGFR (AG1478) NÃO INTERFERIU NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Uma vez que o estímulo com EGF não propiciou aumento do número de células, os efeitos da inibição do EGFR foram avaliados. O inibidor utilizado foi o AG1478, que impede a fosforilação do domínio tirosina quinase de EGFR por competir com o sítio de ligação do ATP, na concentração de 5 μ M. Em todos os experimentos em que o AG1478 foi utilizado, o mesmo foi adicionado 1 hora antes da adição do EGF.

Primeiramente foi analisada a viabilidade das células por citometria de fluxo após tratamento com o inibidor AG1478. Os dados indicaram que o inibidor não foi citotóxico para as células (Figura 18). O grupo controle das células A549 continha 83,7% das células viáveis e o grupo inibido por AG1478, 88,9% de células viáveis (Figura 18 A). O grupo controle das células HK2 continha 79,4% de células viáveis e o grupo inibido por AG1478 apresentou 83,7% de células viáveis (Figura 18 B).

A inibição do EGFR foi confirmada pela detecção da fosforilação desse receptor (p-EGFR) por *Western blotting*. O AG1478 foi capaz de inibir a fosforilação de EGFR nas linhagens A549 e HK2 (Figura 19). Após 1 hora de estímulo com EGF observou-se a expressão de p-EGFR. Entretanto, os níveis de expressão dessa proteína não foram detectados após 1 hora de tratamento com AG1478 na presença de EGF. Os experimentos para verificar os efeitos da inibição de EGFR na proliferação celular seriam realizados após 48 horas de tratamento e devido a isso, foi investigada a atividade do inibidor após esse período. As células estimuladas com EGF, na presença de AG1478, não apresentam expressão de p-EGFR após 48 horas de tratamento, mostrando que a droga continua funcional durante esse período.

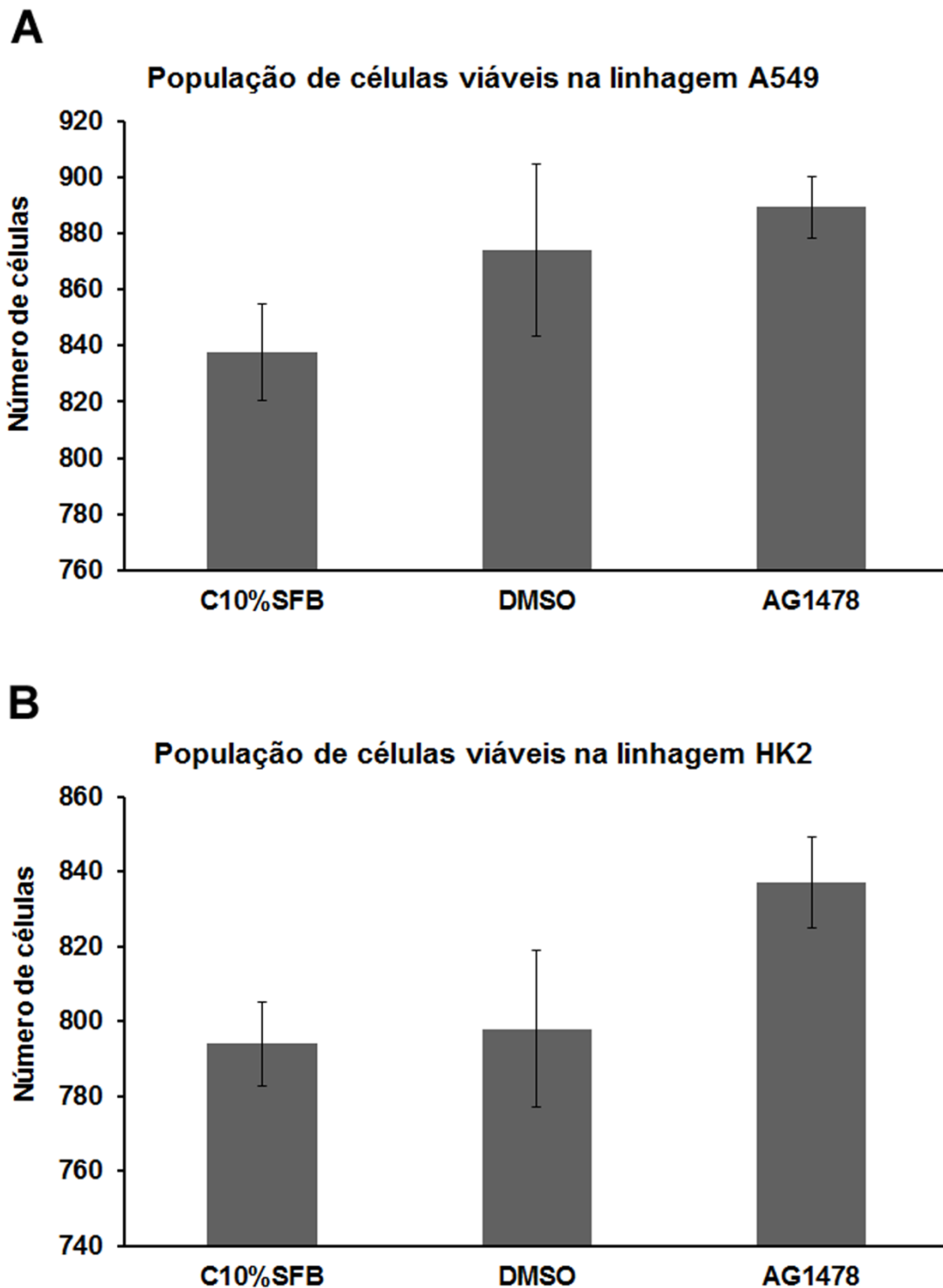


Figura 18 - Teste de viabilidade celular por citometria de fluxo após tratamento com AG1478. As células das linhagens A549 e HK2 foram cultivadas por 48 horas na presença de 10% SFB, DMSO (5 μ M) ou AG1478 (5 μ M). O DMSO foi utilizado como controle, pois é utilizado na diluição do AG1478. **A** - Gráfico mostrando a população de células viáveis na linhagem A549. **B** - Gráfico mostrando a população de células viáveis na linhagem HK2. 2000 células foram analisadas. * $P < 0,05$. Barras = desvio padrão.

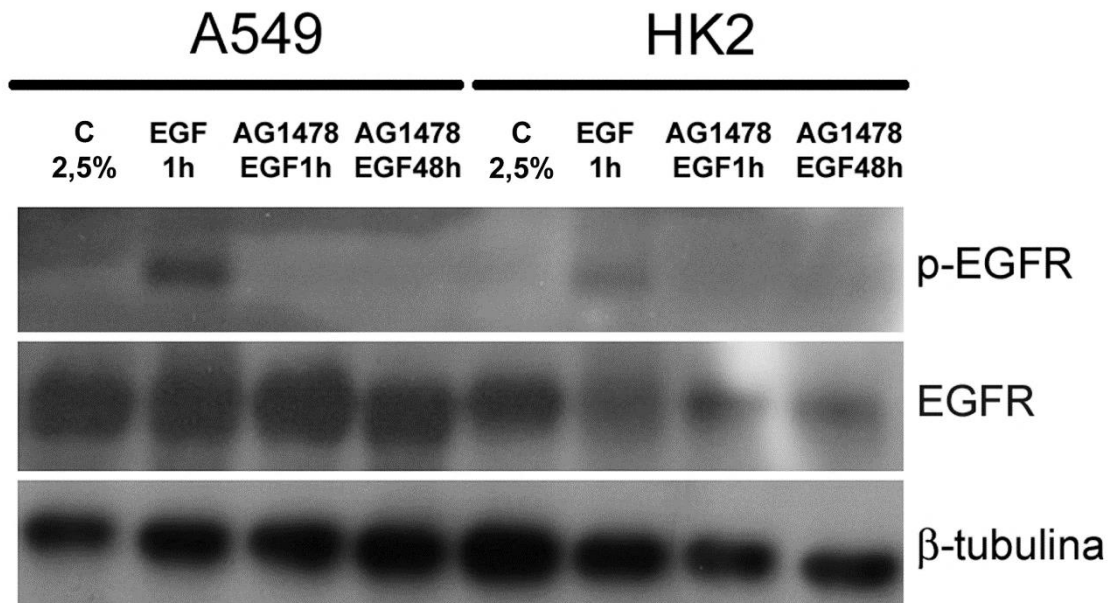


Figura 19 - Inibição da fosforilação do EGFR por AG1478. Os níveis de p-EGFR foram detectados após estímulo com EGF. O tratamento com o inibidor AG1478 (5 μ M), na presença de EGF (100 ng/mL), bloqueou a fosforilação de EGFR e não foi possível detectar a expressão de p-EGFR após 1 hora ou 48 horas da exposição à droga. A proteína tubulina foi utilizada como controle do carregamento do gel.

O passo seguinte foi quantificar o número de células presentes na cultura após o tratamento com AG1478. Ambas as linhagens foram submetidas à carência de soro fetal bovino (2,5% SFB) com a adição de EGF ou AG1478 e o número de células foi quantificado após 48 horas. Os grupos experimentais utilizados foram: células controle cultivadas com 10% de soro fetal bovino (C10% SFB), células controle cultivadas com carência de soro fetal bovino (C2,5% SFB), células estimuladas com EGF (2,5% SFB + EGF), células inibidas com AG1478 e estimuladas com EGF (2,5% SFB + AG1478 + EGF) e células somente com o inibidor (2,5% SFB + AG1478). O AG1478 foi adicionado 1 hora antes da adição do EGF. A inibição de EGFR por AG1478 não alterou o número de células comparando-se com os grupos controle (Figura 20).

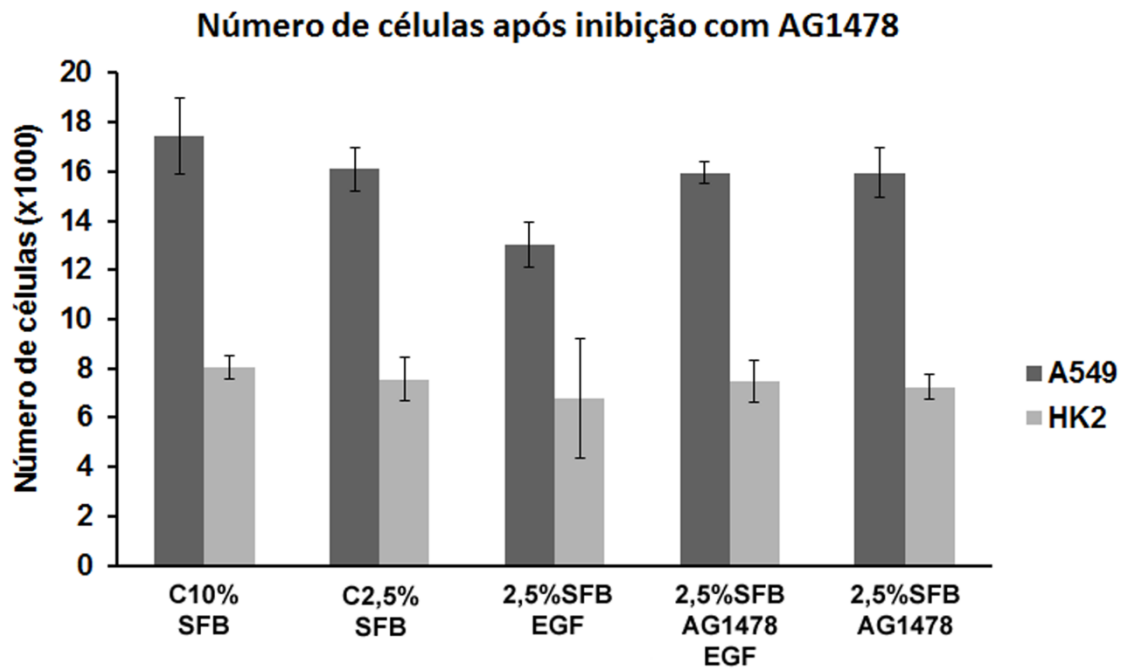


Figura 20 - Determinação do número de células depois da inibição por AG1478. As células A549 e HK2 foram cultivadas em meio contendo 10% SFB, 2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF (100 ng/mL), 2,5% SFB + AG1478 + EGF e 2,5% SFB + AG1478. O número de células foi quantificado após 48 horas. O eixo y indica o número de células por mL na placa. A inibição do EGFR por AG1478 não interferiu na proliferação celular. *P<0,05. Barras = desvio padrão.

4.1.6 EGF PROMOVEU ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS QUE FORAM SUPRIMIDAS PELA INIBIÇÃO COM AG1478

As células das linhagens A549 e HK2 não proliferaram em resposta ao estímulo com EGF, porém foram detectadas alterações morfológicas no citoesqueleto dessas células (Figura 21). As células sem estímulo, controle, apresentam-se organizadas em agrupamentos e justapostas, características de células epiteliais com junções célula a célula.

O estímulo com EGF resultou na inibição da organização das células A549 e HK2 em agrupamentos e as células perderam as características morfológicas de células epiteliais, assumindo morfologia fusiforme. Portanto, as células estimuladas com EGF aparentaram ter perdido a polaridade celular, exibindo alongamentos das células e espalhamento do citoplasma. Outras alterações foram: redução de adesão às células vizinhas, modificações na distribuição dos microfilamentos de actina acompanhando a morfologia fusiforme e presença de protrusões citoplasmáticas. Essas modificações do citoesqueleto de actina não foram observadas nas células tratadas com AG1478 ou com AG1478 na presença de EGF, indicando uma possível recuperação das características de células epiteliais na presença do inibidor.

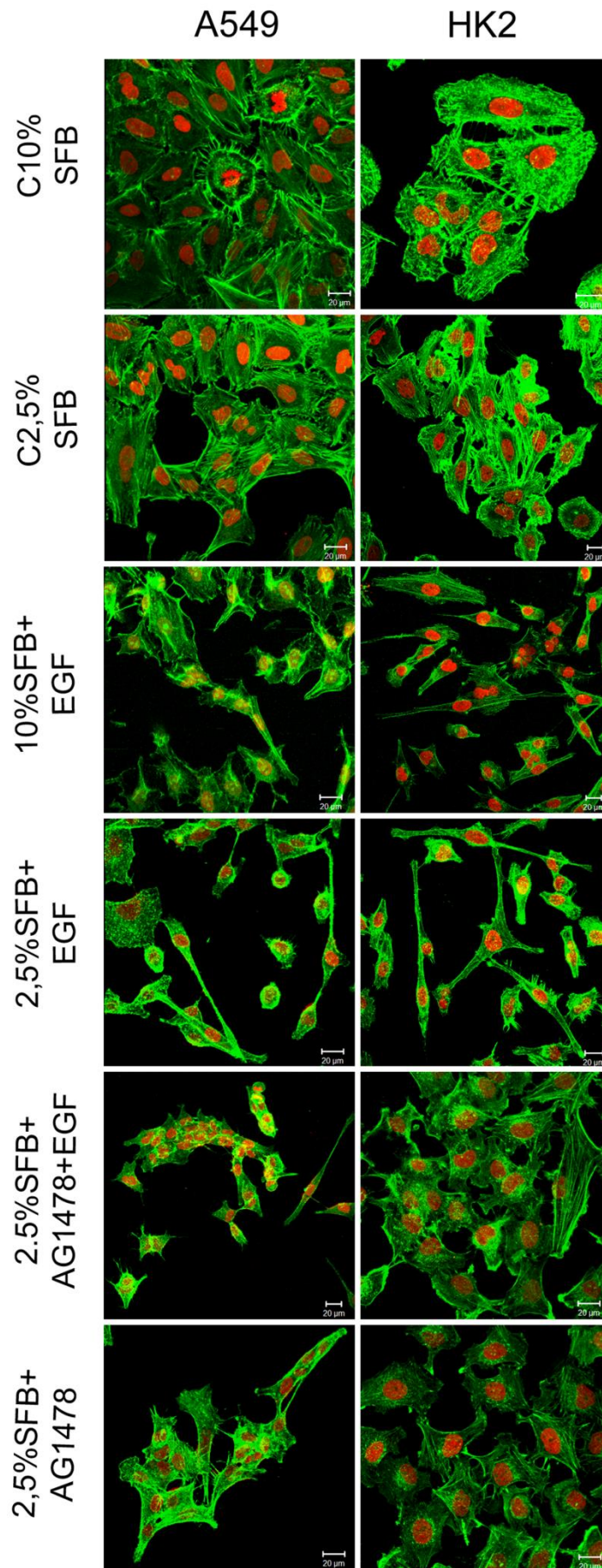


Figura 21 - Avaliação dos efeitos do estímulo com EGF (100 ng/ml) na morfologia celular. As células controle (C10% SFB e C2,5% SFB) estão organizadas em agrupamentos com características de células epiteliais. As células estimuladas pelo EGF (10% SFB + EGF e 2,5% SFB + EGF) apresentaram morfologia fusiforme com a redução de adesão às células vizinhas, alterações na organização dos microfilamentos de actina acompanhando a morfologia fusiforme e protrusões citoplasmáticas. Essas alterações induzidas pelo EGF não foram identificadas nas células tratadas com AG1478 (2,5% SFB + AG1478 + EGF e 2,5% SFB + AG1478). As barras correspondem a 20 μ m.

4.1.7 EGF AUMENTOU A MIGRAÇÃO CELULAR DAS LINHAGENS A549 E HK2

Os métodos de ensaio de ferida e microscopia em tempo real foram utilizados para investigar se as alterações morfológicas causadas pelo estímulo com EGF poderiam estar envolvidas com a migração das células.

O ensaio de ferida demonstrou que o EGF estimulou a migração das células A549 (Figura 22 A) e HK2 (Figura 22 B), contribuindo para o fechamento da ferida. Após 48 horas, as células controle das linhagens A549 e HK2 preencheram 73,45% e 66,66% da área da ferida, respectivamente (Figura 23). As células A549 e HK2 estimuladas com EGF preencheram 90% e 95% da área da ferida, respectivamente (Figura 23). As células tratadas com AG1478 exibiram menor mobilidade quando comparadas com as células estimuladas com EGF, indicando que o aumento da migração das células é mesmo devido à ativação de EGFR com EGF (Figuras 22 e 23). É importante ressaltar que o fechamento da ferida foi devido à migração celular estimulada pelo EGF já que esse ligante não levou ao aumento da proliferação celular.

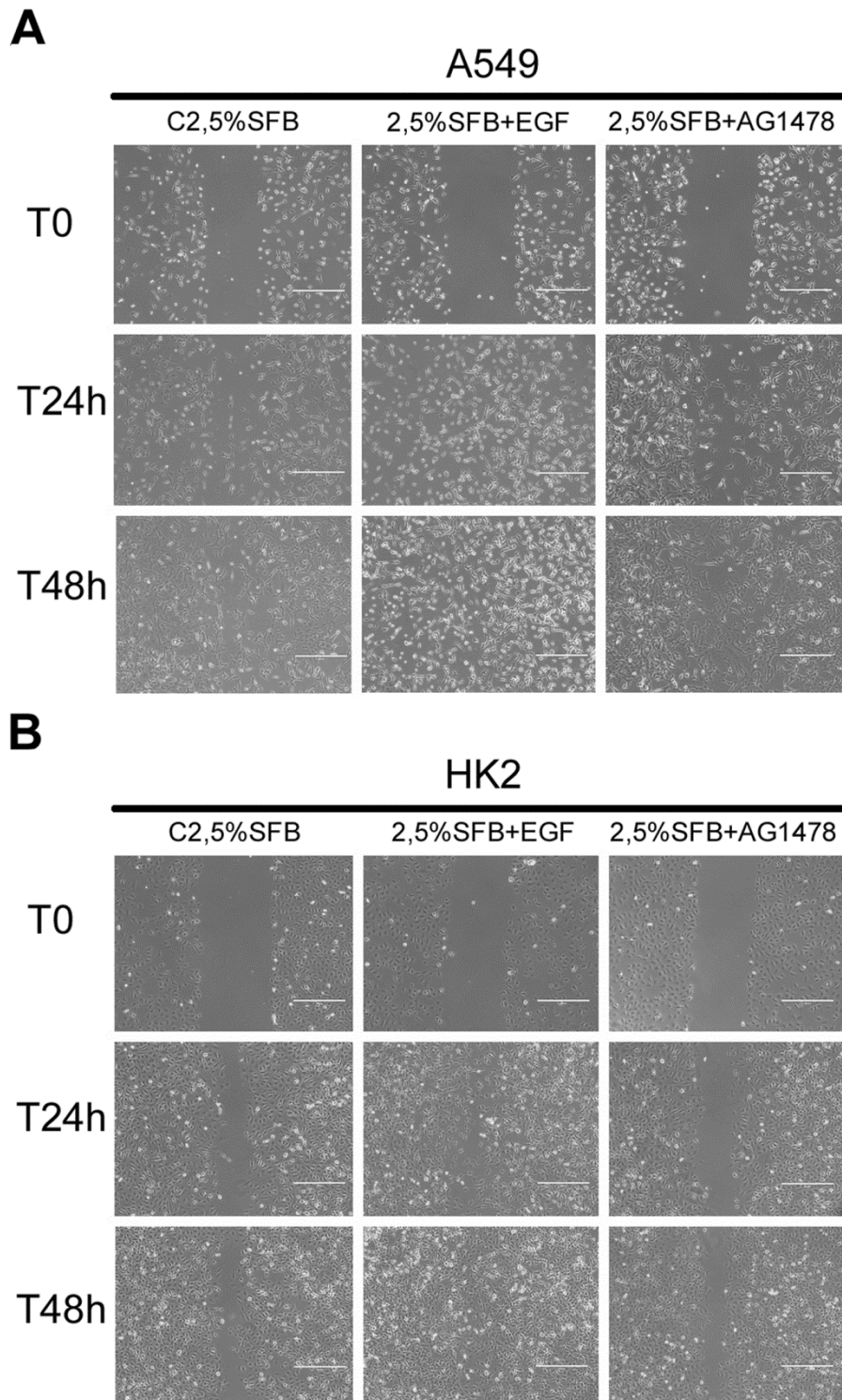


Figura 22 - Ensaio de ferida evidenciando a migração celular induzida pelo EGF. As células foram mantidas com 2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF e 2,5% SFB + AG1478. **A** - Fechamento da ferida pelas células A549. **B** - Fechamento da ferida pelas células HK2. O ensaio de ferida foi feito nas duas linhagens com recuperação de 24 e 48 horas. As barras correspondem a 200 μ m.

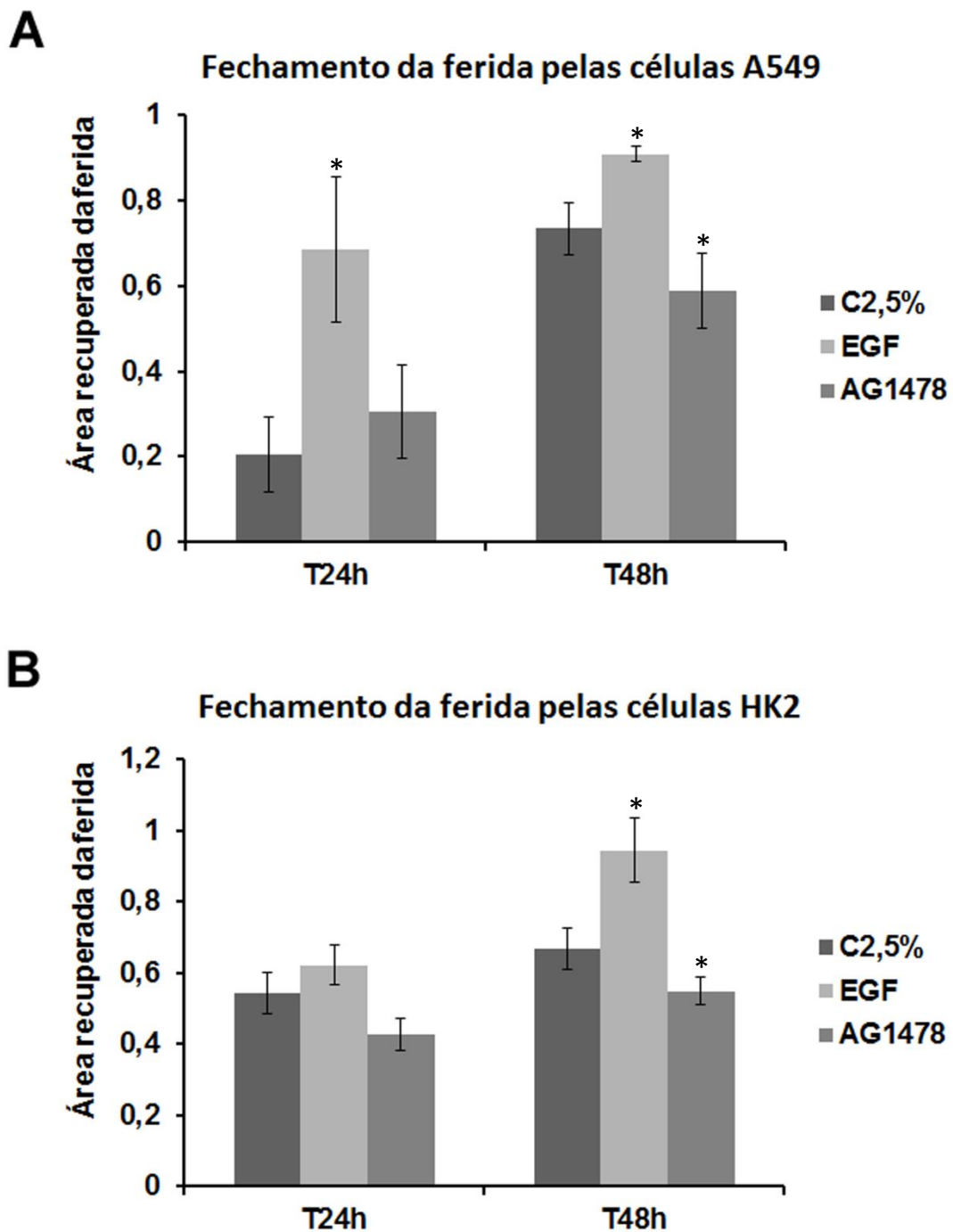


Figura 23 - Gráficos mostrando a frequência de células que recuperaram a área das feridas após 24 e 48 horas de exposição ao EGF ou AG1478. **A** - Recuperação das feridas pelas células A549. **B** - Recuperação das feridas pelas células HK2. As células de ambas as linhagens estimuladas pelo EGF migraram e fecharam a ferida mais rápido comparando-se com as células controle (C2,5% SFB) e com as inibidas pelos AG1478. As células inibidas com AG1478 migraram menos que as células estimuladas com EGF. * $P < 0,05$. Barras = desvio padrão.

Os experimentos com microscopia em tempo real foram realizados com células cultivadas em baixa densidade celular e com nenhum estímulo que permitisse a migração direcionada das células. A velocidade de 30 células em intérfase foi determinada em cada grupo de tratamento, considerando o espaço percorrido por essas células em um período de 12 horas. A figura 24 representa a distância percorrida por algumas células nos diferentes grupos de tratamento das linhagens A549 e HK2. As imagens retratam que a distância total percorrida pelas células A549 e HK2 foi maior na presença de EGF.

O gráfico da figura 25 mostra que o estímulo com EGF promoveu o aumento da migração das células de ambas as linhagens, comparando-se com as células controle. As células A549 e HK2, cultivadas em meio de cultura com 10% SFB, migraram com a velocidade de 10,5 $\mu\text{m}/\text{h}$ e 5,7 $\mu\text{m}/\text{h}$, respectivamente. Quando cultivadas em meio de cultura com 2,5% SFB, migraram com a velocidade de 14 $\mu\text{m}/\text{h}$ (A549) e 5,2 $\mu\text{m}/\text{h}$ (HK2). Depois do estímulo com EGF, as células da linhagem A549 apresentaram a velocidade de 23,3 $\mu\text{m}/\text{h}$ e as células da linhagem HK2, 12 $\mu\text{m}/\text{h}$. As células A549 tratadas com AG1478 apresentaram menor velocidade que a células cultivadas com 2,5% SFB, mas a velocidade foi similar a encontrada nas células cultivadas com 10% SFB. As células da linhagem HK2 não apresentaram diferenças significantes na velocidade das células tratadas com AG1478 comparadas com as células controle (10% SFB e 2,5% SFB).

Pode-se observar nos gráficos da figura 25 que o desvio padrão encontrado foi grande. Isto indica que o comportamento das células foi heterogêneo em uma mesma placa de cultura. Apesar disso, as análises estatísticas mostraram que as células estimuladas com EGF apresentaram maior velocidade quando comparada com as células dos grupos controle.

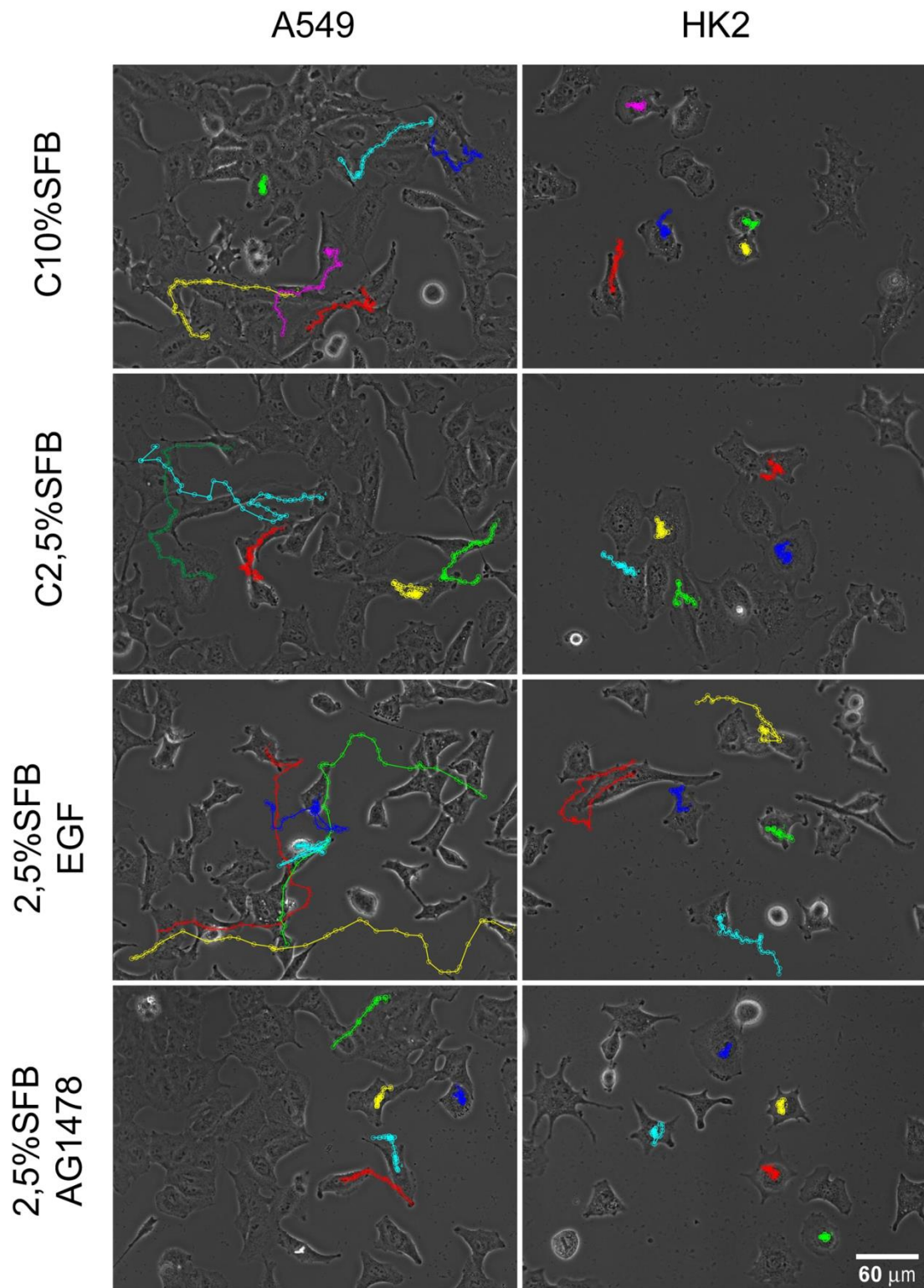


Figura 24 - Distância total percorrida pelas células A549 e HK2 com diferentes tratamentos. A distância total percorrida por ambas as linhagens celulares foi maior na presença de EGF. O deslocamento das células foi obtido pela análise da sequência de imagens capturadas por meio de microscopia em tempo real. A distância total percorrida por 5 células de cada grupo de tratamento está representada pelas rotas coloridas presentes nas imagens, que foram desenhadas a partir do plugin MTrackJ do software Image J.

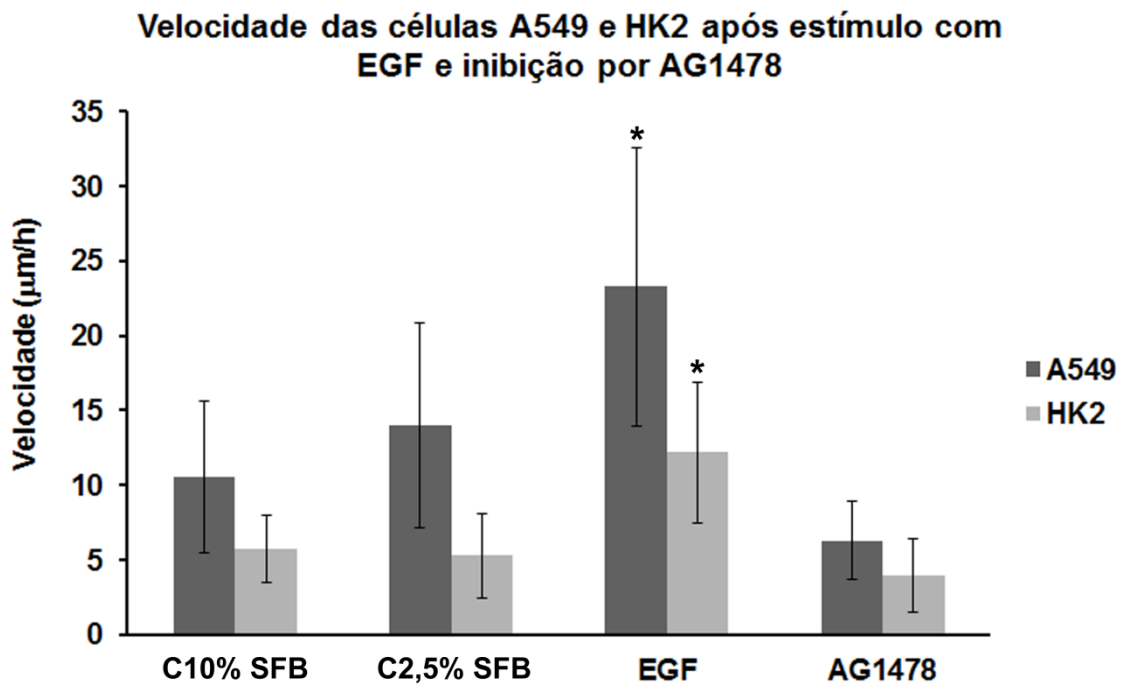


Figura 25 - Velocidade das células após estímulo com EGF ou inibição com AG1478. O estímulo com EGF promoveu o aumento da velocidade das células A549 e HK2, comparando-se com as células sem estímulo (C10% SFB e C2,5% SFB). Os experimentos com microscopia em tempo real foram realizados sem estímulo direcional para a migração das células. A velocidade de 30 células por grupo de tratamento foi quantificada, considerando a rota percorrida por elas em um período de 12 horas. * $P < 0,05$. Barras = desvio padrão.

4.1.8 O EGF INDUZIU A TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL PARA PROMOVER A MIGRAÇÃO?

O estímulo com EGF induziu a migração das células A549 e HK2 e o próximo passo foi avaliar se essa migração foi devida à transição epitélio mesenquimal. Para isso, os níveis de expressão de proteínas expressas por células mesenquimais (vimentina) ou por células epiteliais (citoqueratina 18 e E-caderina) foram avaliados (Figura 26).

Não foram observadas alterações nos níveis de expressão das proteínas vimentina, citoqueratina 18 e E-caderina após 48 horas de estímulo com EGF nos lisados de células da linhagem A549. Padrões similares de expressão dessas proteínas foram também encontrados nos lisados das células da linhagem HK2, com a diferença que não foi detectada a expressão de E-caderina nessa linhagem. Os dados obtidos com o *Western blotting*

mostram que não há evidências que o estímulo com EGF tenha promovido a transição epitélio mesenquimal.

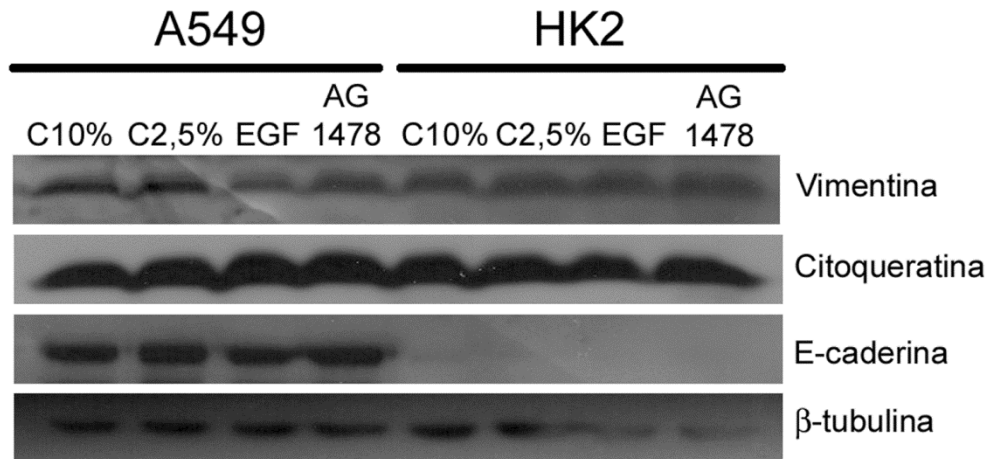


Figura 26 - Detecção da expressão de vimentina, citoqueratina-18 e E-caderina por *Western blotting*. Os grupos analisados foram: C10% SFB, C2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF e 2,5% SFB + AG1478. As células foram mantidas em cultura por 48 horas após adição dos tratamentos. O EGF não causou alterações na expressão de proteínas relacionadas com a transição epitélio mesenquimal nas linhagens A549 e HK2.

Foi investigada também a localização celular de E-caderina por meio de imunofluorescência (Figura 27). As células controle (10% SFB e 2,5% SFB) da linhagem A549 apresentaram a marcação da E-caderina entre as células, na região que deve corresponder a junções, e após o estímulo com EGF essa marcação diminuiu em intensidade e frequência. Não foi encontrada a marcação para E-caderina nas células da linhagem HK2 em nenhum dos grupos analisados. Esses dados concordam com os dados obtidos pelo *Western blotting* (Figura 26), em que a E-caderina foi detectada na linhagem A549 e não foi detectada na linhagem HK2. A diminuição do sinal da marcação de E-caderina na região que deve corresponder a junções entre as células, observada após estímulo com EGF na linhagem A549, pode ser um indício de indução de transição epitélio mesenquimal pelo EGF.

A expressão dos RNAs mensageiros que codificam as proteínas vimentina, citoqueratina 18, E-caderina e N-caderina também foram avaliados por PCR quantitativo em tempo real (Figura 28). A N-caderina é outra proteína relacionada com a transição epitélio mesenquimal, expressa por células mesenquimais. A linhagem A549 (Figura 28 A), após estímulo com EGF, apresentou pequeno aumento nos níveis de RNAm para a proteína E-caderina e um discreto aumento do RNAm para N-caderina, comparando-se com o grupo

2,5% SFB. Não foi observada alteração nos níveis de expressão de RNAm para vimentina e citoqueratina 18. As células HK2 (Figura 28 B), após estímulo com EGF, apresentaram um discreto aumento no RNAm para vimentina e um aumento considerável do RNAm de E-caderina. Os dados em conjunto não sustentam a hipótese de que o EGF induz a transição epitélio mesenquimal nas células A549 e HK2.

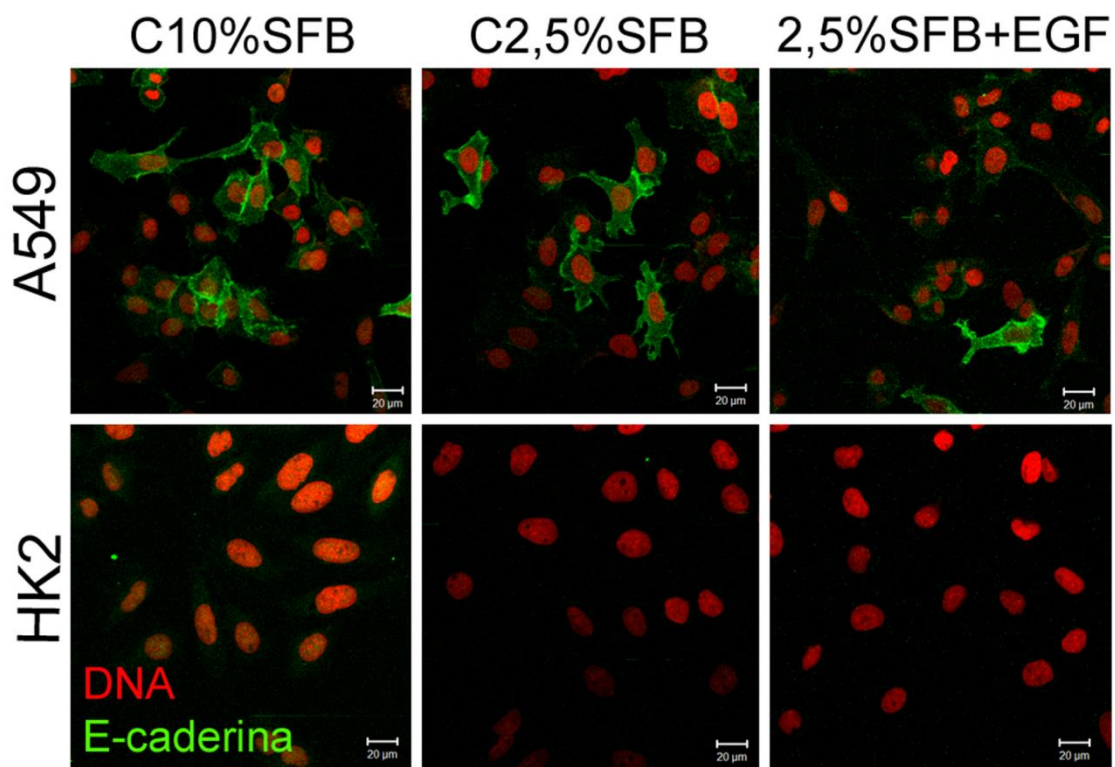


Figura 27 - Detecção da marcação de E-caderina por meio de imunofluorescência. Os grupos utilizados para a análise foram: C10% SFB, 2,5% SFB e 2,5% SFB + EGF. As células foram mantidas em cultura por 48 horas após adição dos tratamentos. Utilizou-se um anticorpo para E-caderina (verde) e os núcleos foram corados com iodeto de propídeo (vermelho).

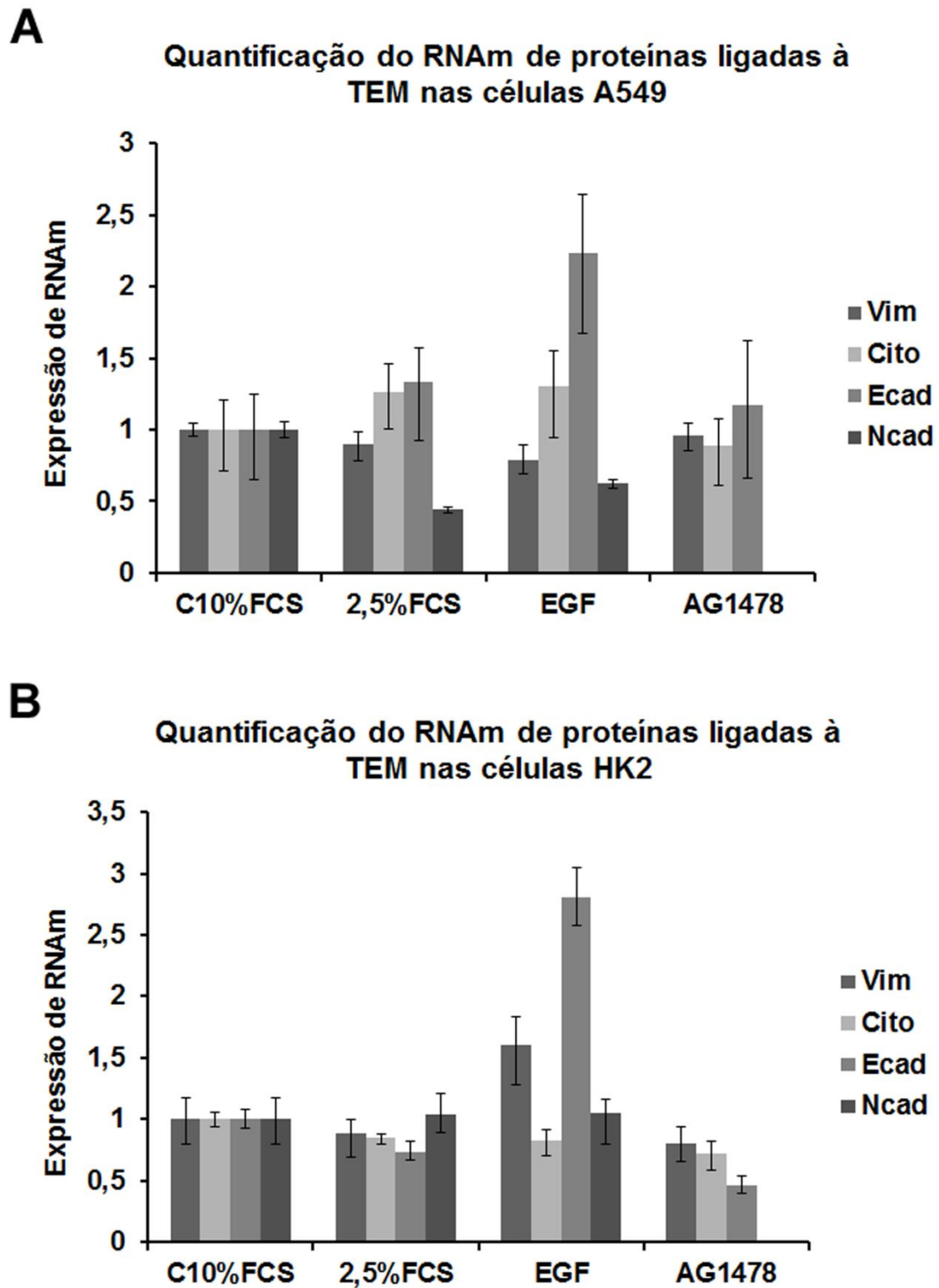


Figura 28 - Quantificação dos níveis de expressão do RNAm para vimentina, citoqueratina-18, E-caderina e N-caderina por PCR quantitativo em tempo real. **A** - Resultados com a linhagem A549. **B** - Resultados com a linhagem HK2. Os grupos analisados foram: C10% SFB, C2,5% SFB e 2,5% SFB + EGF. TEM = transição epitélio mesenquimal, Vim=vimentina, Cito=citoqueratina, Ecad=E-caderina e Ncad=N-caderina. Barras = desvio padrão.

4.2 CULTURA 3D – CULTIVO, MORFOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DOS ESFEROIDES

4.2.1 CULTIVO DAS CÉLULAS A549 E HK2 EM PLACAS NÃO ADERENTES

O cultivo das células para obtenção de esferoides foi baseado no protocolo desenvolvido previamente pelo grupo do laboratório (AMARAL et al., 2011). As células das linhagens A549 e HK2 foram cultivadas em placas de Petri de plástico, sem tratamento para adesão celular. A densidade inicial foi de 4×10^5 células em 5 ml de meio de cultura (10% SFB) por placa. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C. Após 24 horas de cultivo, as células formaram aglomerados celulares espontâneos. Entretanto, após 48 horas, não havia mais aglomerados em suspensão e as células encontravam-se aderidas às placas promovendo a dissociação dos aglomerados (Figura 29).

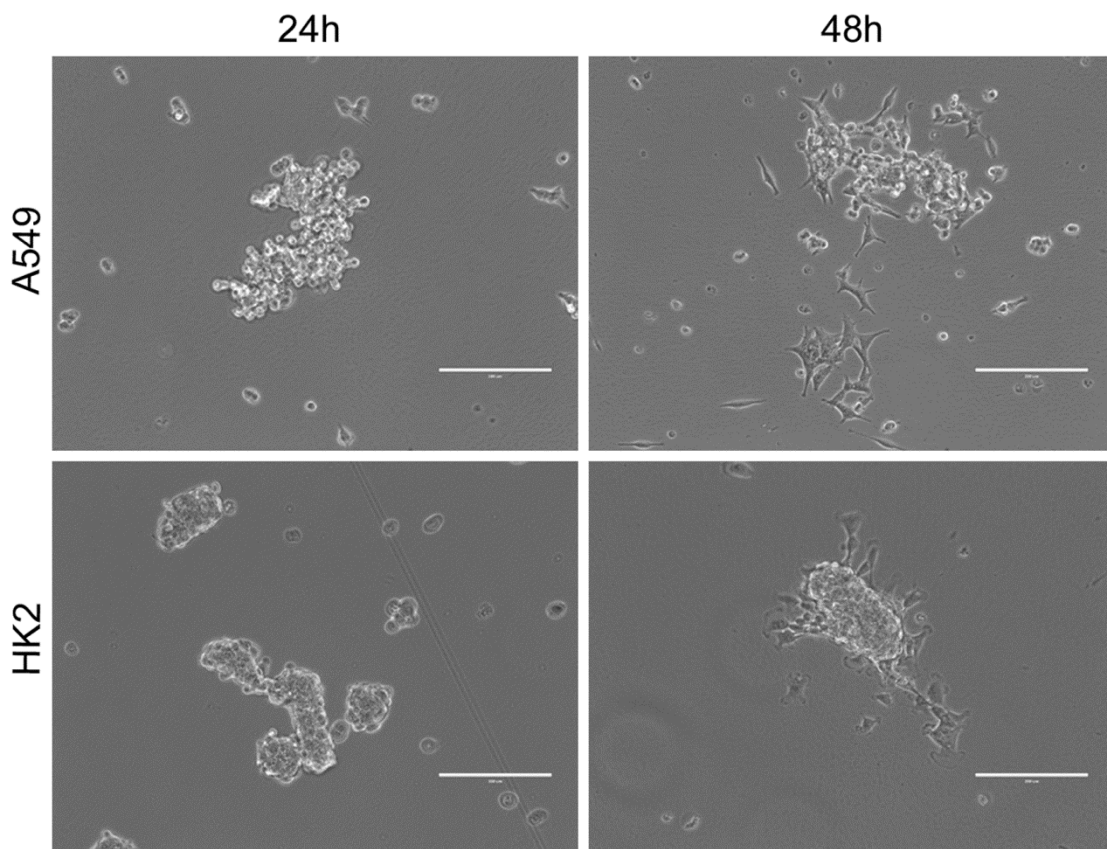


Figura 29 - Formação de aglomerados espontâneos de células mantidas sem agitação em placa não aderente. Após 24 horas de cultura é possível observar os aglomerados de células em suspensão, mas após 48 horas os aglomerados encontram-se aderidos às placas. As barras correspondem a 200 μ m.

4.2.2 CULTIVO DAS CÉLULAS A549 E HK2 EM PLACAS NÃO ADERENTES SOB ROTAÇÃO DE 10 RPM

Visto que somente manter as células em placas não aderentes não propiciou a obtenção de esferoides, o próximo passo foi mantê-las na estufa sobre um agitador com rotação de 10 rpm.

As células das linhagens A549 e HK2 foram novamente cultivadas em placas de Petri de plástico, sem tratamento para adesão celular, com inóculo inicial de 4×10^5 em 5 ml de meio de cultura, porém mantidas na estufa sob rotação. Após 48 horas de cultivo, observou-se a formação de pequenos aglomerados (Figura 30), menores em relação àqueles formados nas placas mantidas sem agitação (Figura 29). Entretanto, mesmo com a agitação de 10 rpm, pode-se observar células aderidas às bases das placas (Figura 30).

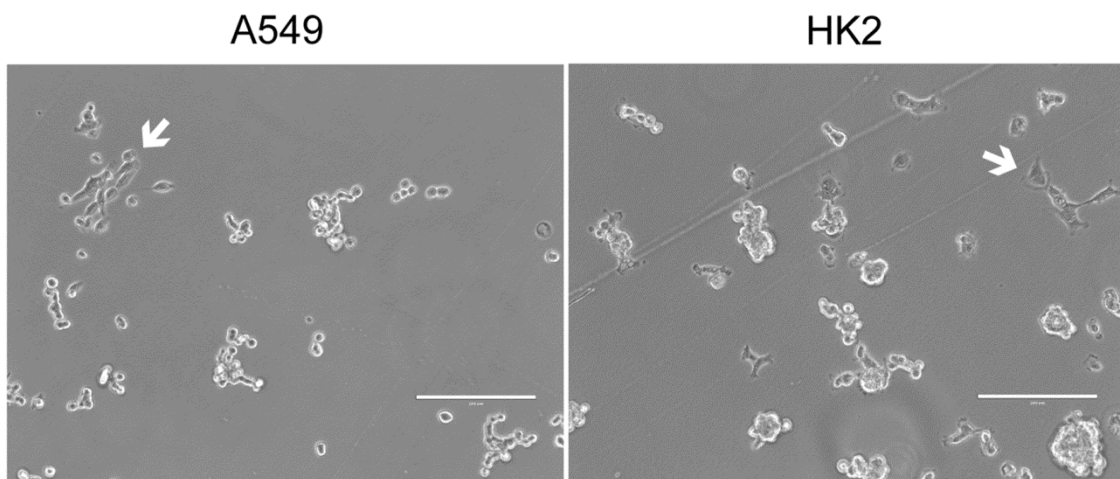


Figura 30 - Formação de aglomerados espontâneos de células em suspensão após cultivo em placa não aderente sob rotação de 10 rpm. As setas apontam para células aderidas após 48 horas em cultura. As barras correspondem a 200 μm.

4.2.3 CULTIVO DAS CÉLULAS A549 E HK2 EM PLACAS NÃO ADERENTES SOB ROTAÇÃO DE 20 RPM

A fim de reduzir a adesão das células A549 e HK2 às placas, a rotação foi aumentada para 20 rpm. Esse novo método de cultivo com rotação de 20 rpm impediu que as células de ambas as linhagens aderissem à placa. No entanto, essa rotação propiciou a adesão entre os agregados presentes no centro das placas, formando um grande e único agregado de células (Figura 31).

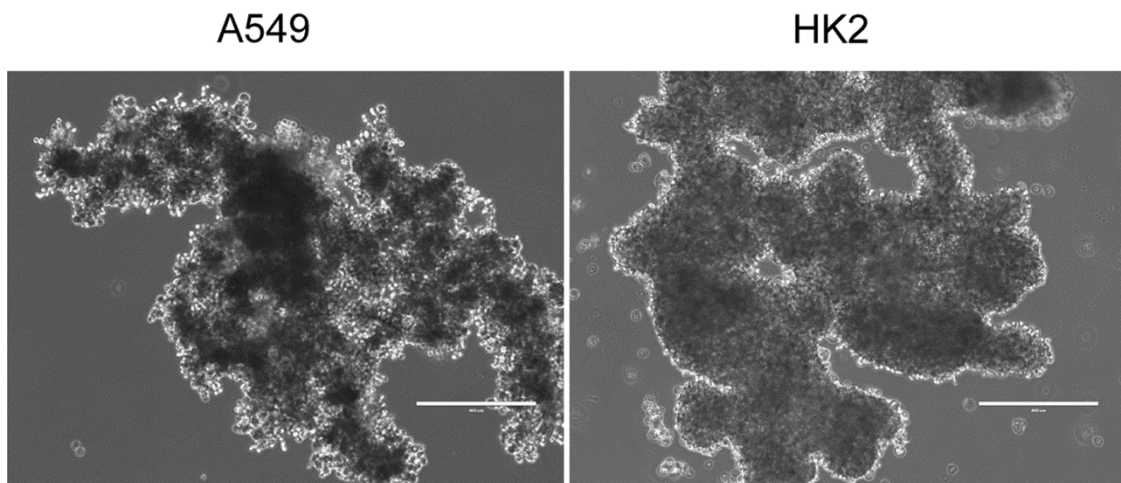


Figura 31 - Agregados celulares formados após 48 horas de cultivo das linhagens A549 e HK2 em placa não aderente sob rotação de 20 rpm. As barras correspondem a 200 μm .

4.2.4 CULTIVO DAS CÉLULAS A549 E HK2 EM PLACAS NÃO ADERENTES SOB ROTAÇÃO ALTERNADA DE 20 RPM

O protocolo inicial para a realização da cultura 3D foi modificado devido às dificuldades encontradas para obtenção dos esferoides. As células das linhagens A549 e HK2 foram colocadas em placas de Petri conforme já descrito nos parágrafos acima. Dessa vez, no entanto, as placas foram mantidas por 24 horas na estufa sem rotação. Neste período as células poderiam se aderir umas às outras e formar os pequenos agregados espontaneamente, sendo que algumas poderiam aderir às placas. Após esse período, as

células que aderiram às placas foram cuidadosamente soltas do fundo das placas, com auxílio de uma pipeta, para não desfazer os agregados já formados. Então, as placas foram recolocadas na estufa sob agitação de 20 rpm, alternando-se o sentido da agitação, com uma volta no sentido horário e outra no sentido anti-horário. Esse tipo de rotação evitou a adesão entre os esferoides no centro das placas e dos esferoides às placas durante o cultivo. Desta forma, esferoides de ambas as linhagens foram obtidos, com um número considerável de esferoides por placa. A figura 32 contém imagens dos esferoides das duas linhagens após 48 horas, 7 e 14 dias de cultivo.

Após 48 horas de cultivo não foram observadas células aderidas às placas. Os esferoides formados pela linhagem HK2 se mostraram esféricos durante todo o período da cultura. Já os esferoides da linhagem A549 são irregulares após 48 horas, formando estruturas semelhantes a “cachos de uva”. Após 7 dias de cultivo, foram encontrados esferoides esféricos das células A549, mas ainda havia esferoides organizados na forma de “cachos de uva”. A partir do 9º dia de cultivo, os esferoides da linhagem A549 tornaram-se esféricos como os formados pelas células da linhagem HK2 (Figura 32). Esse foi o método escolhido para a produção de esferoides pelas linhagens A549 e HK2.

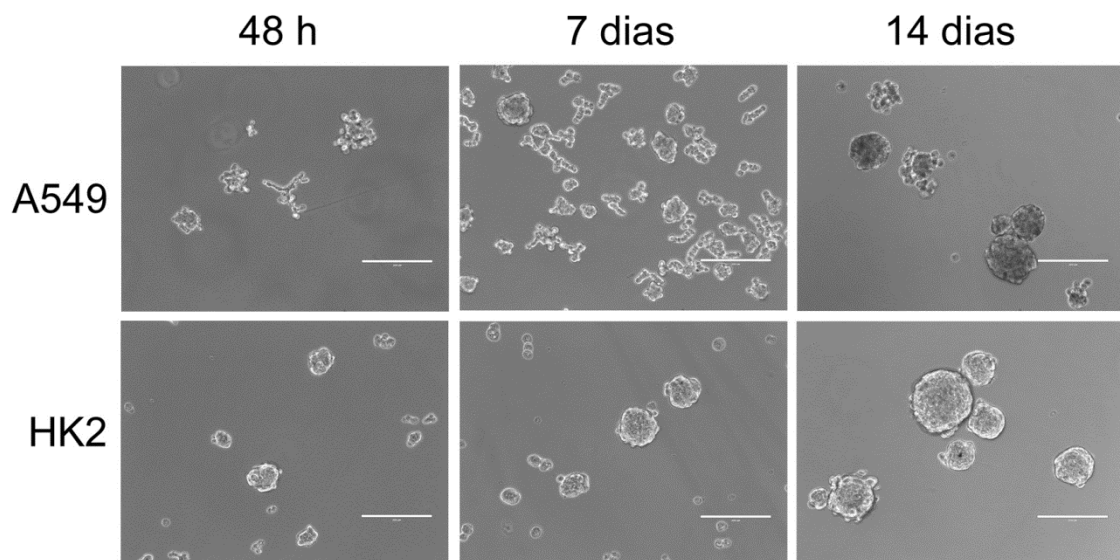


Figura 32 - Esferoides formados pelas linhagens A549 e HK2 após 48 horas, 7 e 14 dias de cultura sob rotação de 20 rpm. A rotação foi alternada, com uma volta para o sentido horário e outra para o sentido anti-horário. Os esferoides da linhagem HK2 são esféricos desde o início da cultura e os formados pela linhagem A549 tem formato irregular no início, se tornando esféricos no decorrer do tempo de cultura. As barras correspondem a 200 μ m.

4.2.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESFEROIDES POR COLORAÇÃO DOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA E NÚCLEO

As características morfológicas dos esferoides com 7 e 14 dias de cultivo foram avaliadas por meio de coloração dos microfilamentos de actina e do núcleo. A figura 33 ilustra os dados das culturas após 7 e 14 dias de cultivo. Após 7 dias em cultura, o formato dos esferoides foi irregular na linhagem A549 em comparação com a linhagem HK2. As células da linhagem A549 se organizaram formando agregados com ramificações contendo células enfileiradas, lembrando um “cacho de uva”. As células da linhagem HK2 formaram esferoides esféricos após 7 dias em cultura, formato observado desde o início da cultura. Após 14 dias em cultura, formaram-se esferoides esféricos em ambas as linhagens.

A coloração do núcleo mostrou indícios de células em apoptose e em mitose nos esferoides de ambas as linhagens após 7 dias de cultura (Figura 34). Após 14 dias de cultivo, os esferoides da linhagem A549 apresentaram fragmentação nuclear preferencialmente localizada no centro do esferoide, mas houve detecção da presença deste evento também em sua periferia. As mitoses estavam localizadas preferencialmente na periferia. Já na HK2, detectou-se apoptose e mitose tanto no centro como na periferia dos esferoides (Figura 35).

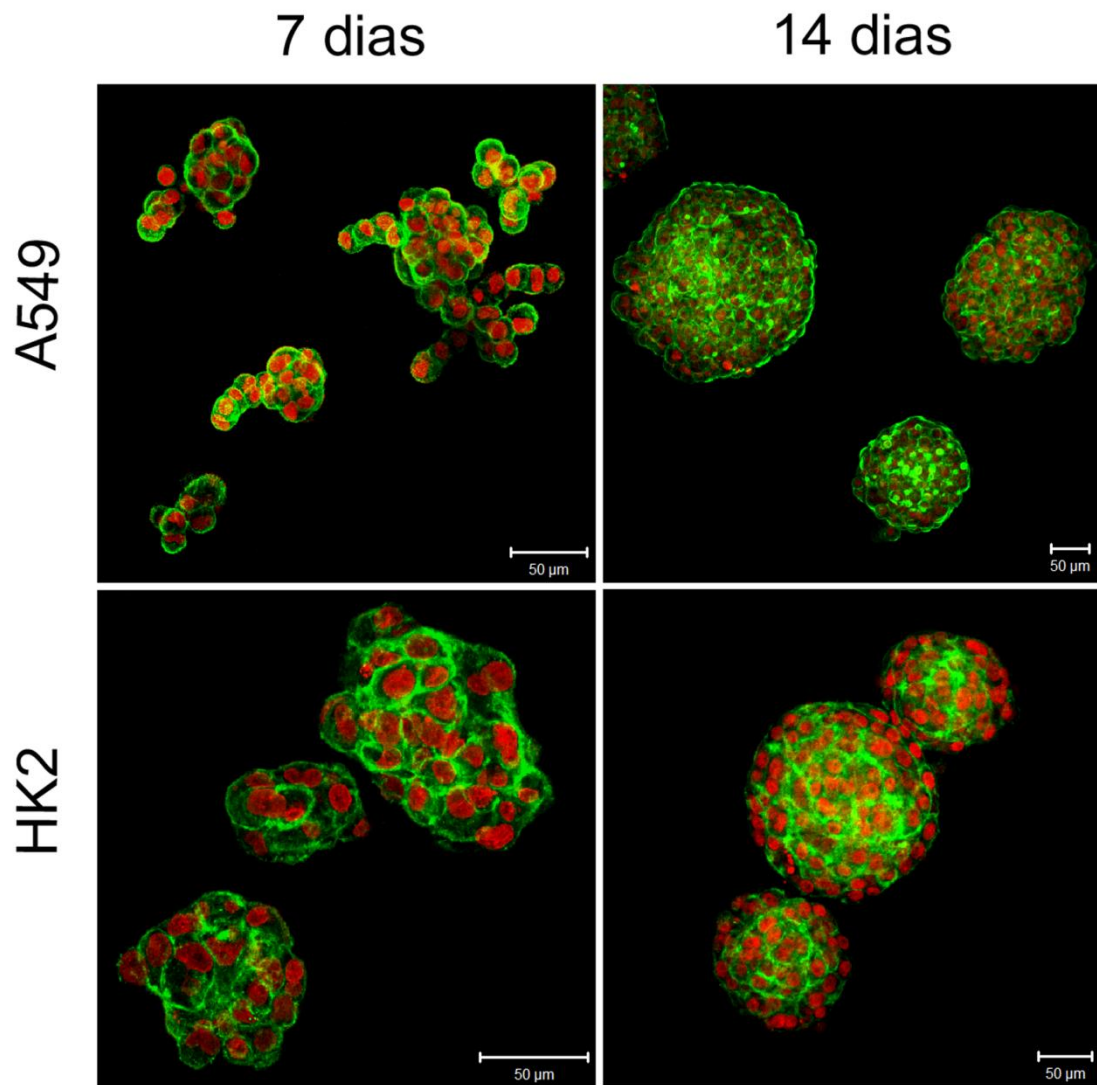


Figura 33 - Esferoides formados pelas linhagens A549 e HK2 após 7 e 14 dias em cultura. Os microfilamentos de actina foram corados com faloidina-FITC e estão apresentados em verde e os núcleos, corados com iodeto de propídeo, em vermelho. Os esferoides da linhagem A549 são irregulares, apresentando prolongamentos com células enfileiradas, lembrando a forma de “cachos de uva”, em 7 dias de cultura. Após 14 dias em cultura, os esferoides se tornam esféricos. A linhagem HK2 apresenta esferoides esféricos desde o início da cultura.

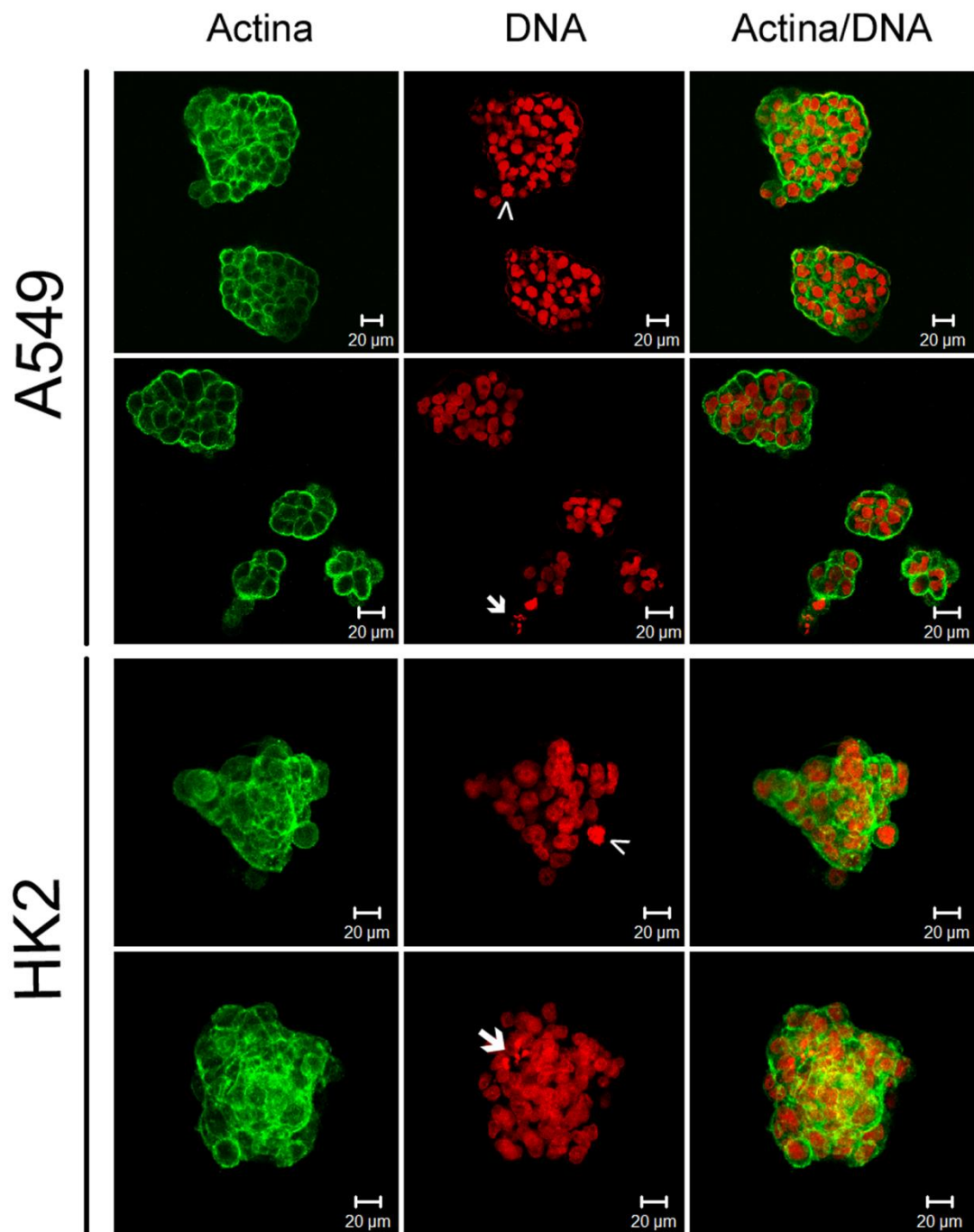


Figura 34 - Morfologia dos esferoides formados a partir de células das linhagens A549 e HK2 após 7 dias de cultivo. Os microfilamentos de actina foram corados com faloidina - FITC e estão apresentados em verde e os núcleos, corados com iodeto de propídeo, em vermelho. As setas apontam para figuras apoptóticas e as cabeças de setas para as mitoses.

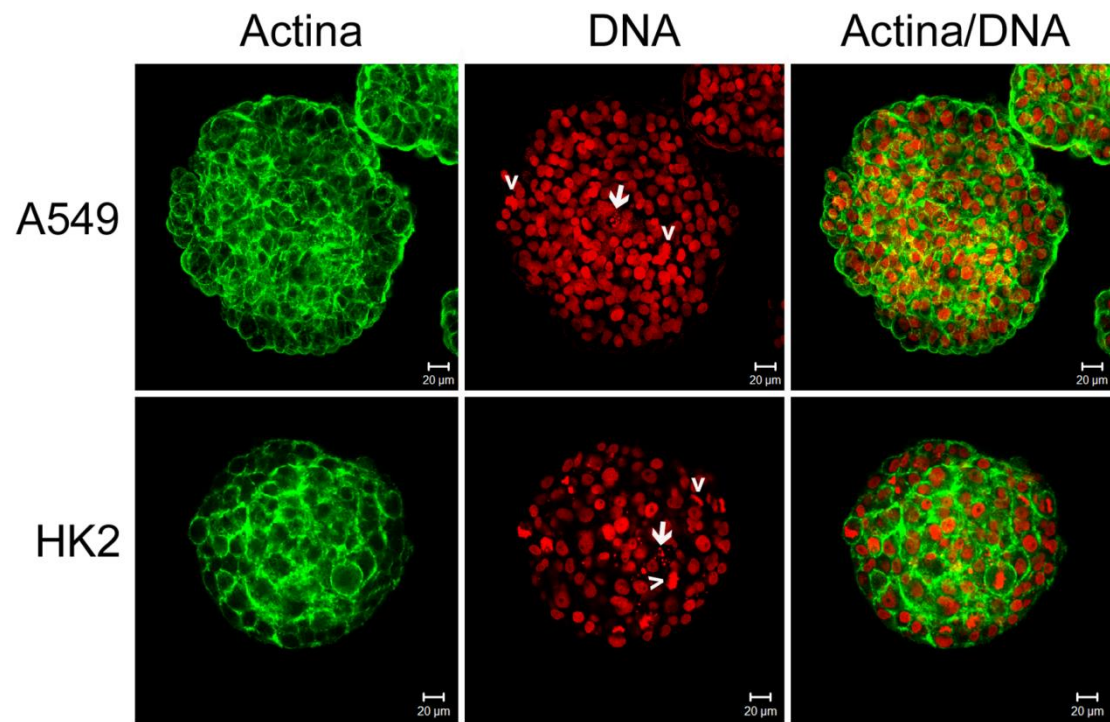


Figura 35 - Morfologia dos esferoides formados a partir de células das linhagens A549 e HK2 após 14 dias de cultivo. Os microfilamentos de actina foram corados com faloidina - FITC e estão apresentados em verde e os núcleos, corados com iodeto de propídeo, em vermelho. As setas apontam para figuras apoptóticas e as cabeças de setas para as mitoses.

4.2.6 PRESENÇA DE FIGURAS APOPTÓTICAS NO CENTRO DOS ESFEROIDES DA LINHAGEM A549

Os esferoides das linhagens A549 e HK2 foram cultivados por 14 dias, fixados e processados para a realização de cortes histológicos. A análise de lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina mostraram que os esferoides da linhagem A549 continham células justapostas por todo o esferoide e com células apresentando indícios de apoptoses na região central do esferoide, possivelmente o início da formação de um lúmen (Figura 36 A e A'). Os esferoides da linhagem HK2 não apresentaram indício de apoptose na região central e foi possível observar que as células não se apresentavam justapostas, com a presença de espaços entre elas (Figura 36 B e B').

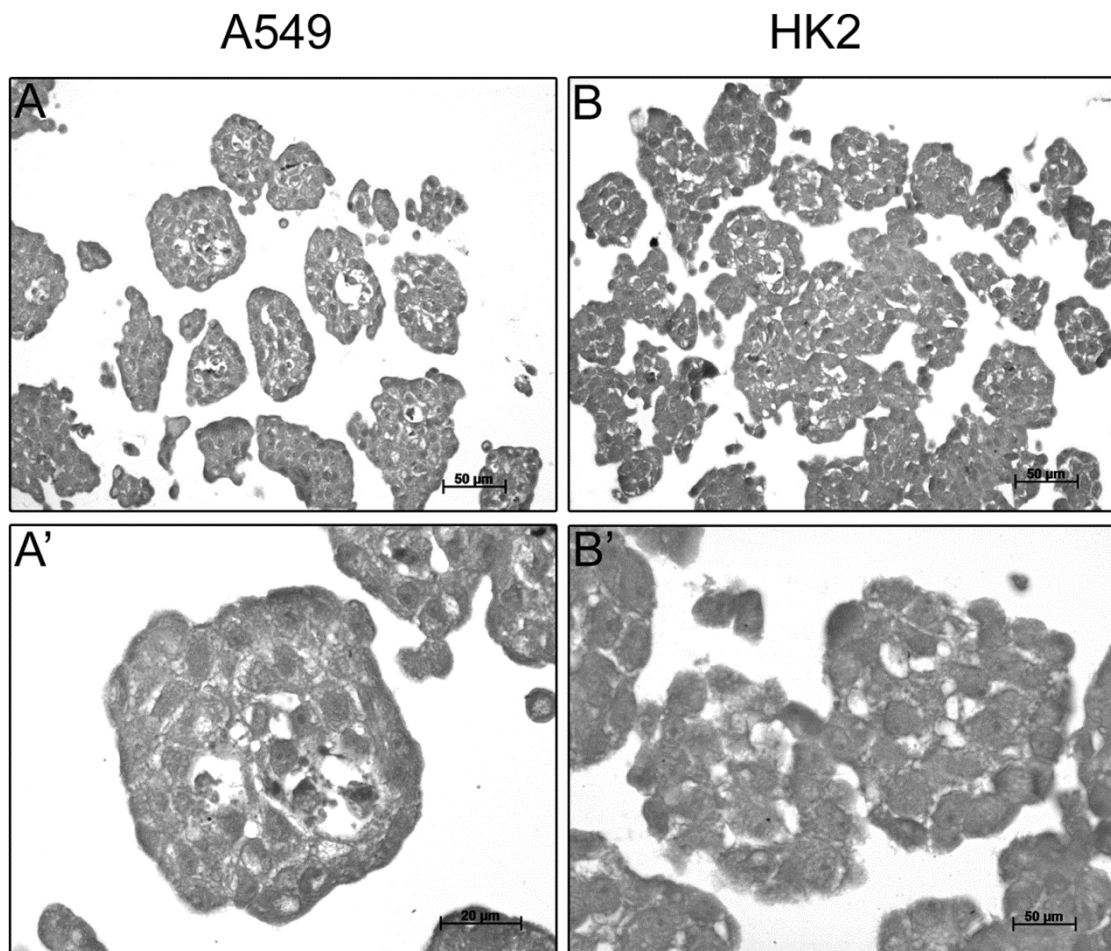


Figura 36 - Cortes histológicos dos esferoides formados após 14 dias de cultura pelas linhagens A549 e HK2, corados com hematoxilina e eosina. **A** - Visão geral de esferoides formados pela linhagem A549, mostrando a presença de possível lúmen na região central. **A'** - Esferoide (A549) em maior aumento mostrando a presença de figuras apoptóticas em seu centro. **B** - Visão geral de esferoides formados pela linhagem HK2. **B'** - Esferoide (HK2) em maior aumento. Há presença de espaços entre as células HK2, não observados entre as células A549.

4.2.7 CARACTERIZAÇÃO DOS ESFEROIDES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os esferoides formados pelas células A549 e HK2 foram fixados após 14 dias de cultivo e a morfologia de suas células foi observada ao microscópio eletrônico de transmissão (Figura 37).

As células da linhagem A549 apresentaram características de células epiteliais, com contorno regular e justaposição das membranas entre as células adjacentes (Figura 37 A) e com a presença de junções aderentes e desmossomos entre as células (Figura 37 A').

As células da linhagem HK2 apresentam contorno irregular da membrana celular, com protruções e dobras na membrana, dificultando a visualização de justaposição das membranas entre as células adjacentes (Figura 37 B). Entre os dobramentos das membranas foram observados indícios de secreção celular com elementos característicos de componentes da matriz extracelular (Figura 37 B').

Os espaços encontrados entre as células nos esferoides da linhagem HK2, observados nos cortes histológicos (Figura 36 B e B'), podem ser decorrentes dos dobramentos da membrana encontrados nos esferoides da linhagem HK2. Pode-se observar também, na figura 32, que os esferoides formados pela linhagem A549, aos 14 dias, têm mais células por área, sendo mais densos que os da linhagem HK2. A presença de materiais amorfos de matriz extracelular, entre as células dos esferoides da linhagem HK2, confere ao material menor densidade de células justapostas, que permite a passagem de mais luz e torna o esferoide mais claro na imagem.

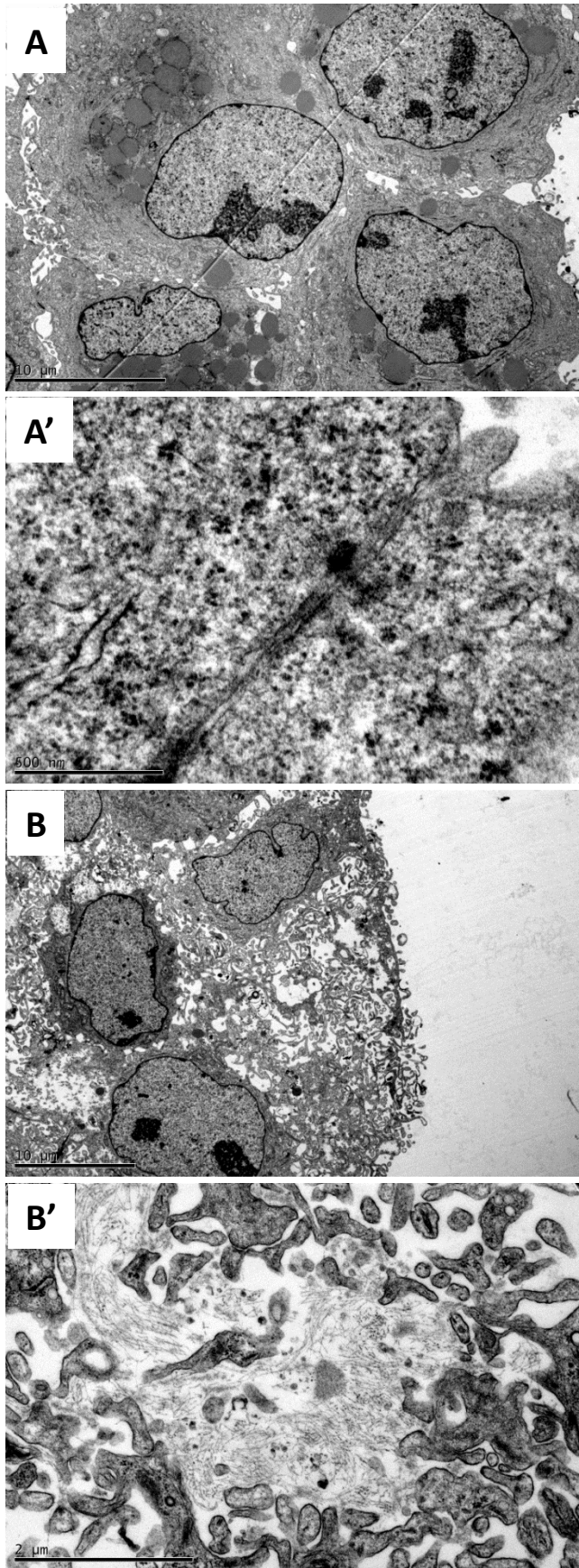


Figura 37 - Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão dos esferoides formados pelas linhagens A549 e HK2 após 14 dias de cultivo. **A** - Células da linhagem A549 com características de células epiteliais, justapostas umas às outras. A barra equivale a 10 µm. **A'** - Maior aumento mostrando junções aderentes e desmossomo entre as células A549 dos esferoides. A barra equivale a 500 nm. **B** - As células HK2 possuem o contorno da membrana celular de forma irregular, com muitas protrusões e dobras de membrana. A barra equivale a 10 µm. **B'** - Entre as protrusões das células HK2 há a deposição de elementos da matriz extracelular. A barra equivale a 2 µm.

4.2.8 CURVA DE CRESCIMENTO, CICLO CELULAR E ÁREA DOS ESFEROIDES DAS LINHAGENS A549 E HK2

Os esferoides foram cultivados por 14 dias e durante este período foi realizada a curva de crescimento das células, como descrito em material e métodos. Antes da dissociação das células por tripsina, os esferoides foram fotografados para documentação de sua morfologia nos dias da coleta (Figura 38 A). Como já descrito acima, os esferoides da linhagem A549 até o 7º dia de cultura apresentam formato irregular e a partir do 9º dia de cultura passam a ser esféricos. Já os esferoides formados a partir da linhagem HK2 são esféricos desde o início da cultura.

As células dos esferoides foram dissociadas com tripsina nos seguintes dias da cultura: 2º, 4º, 7º, 9º, 11º e 14º. Após a contagem do número de células, as amostras foram fixadas para a avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.

As células dos esferoides de ambas as linhagens passaram por fases de proliferação celular, verificado pelo aumento do número de células, e fases de provável morte celular demonstrada pela diminuição no número de células na cultura (Figura 38 B). Entretanto, não houve diferença estatística na frequência de células entre os dias analisados. O número de células na cultura se manteve constante durante todo o período de cultivo dos esferoides.

Os esferoides aumentam de tamanho no decorrer do tempo (Figura 38 A). Isso pode ser devido ao agrupamento entre esferoides e também pela proliferação celular, já que foram observadas mitoses nos esferoides. O fato do número de células se manter constante na cultura pode ser devido a presença de morte celular nos esferoides, havendo um balanço entre a proliferação e a morte.

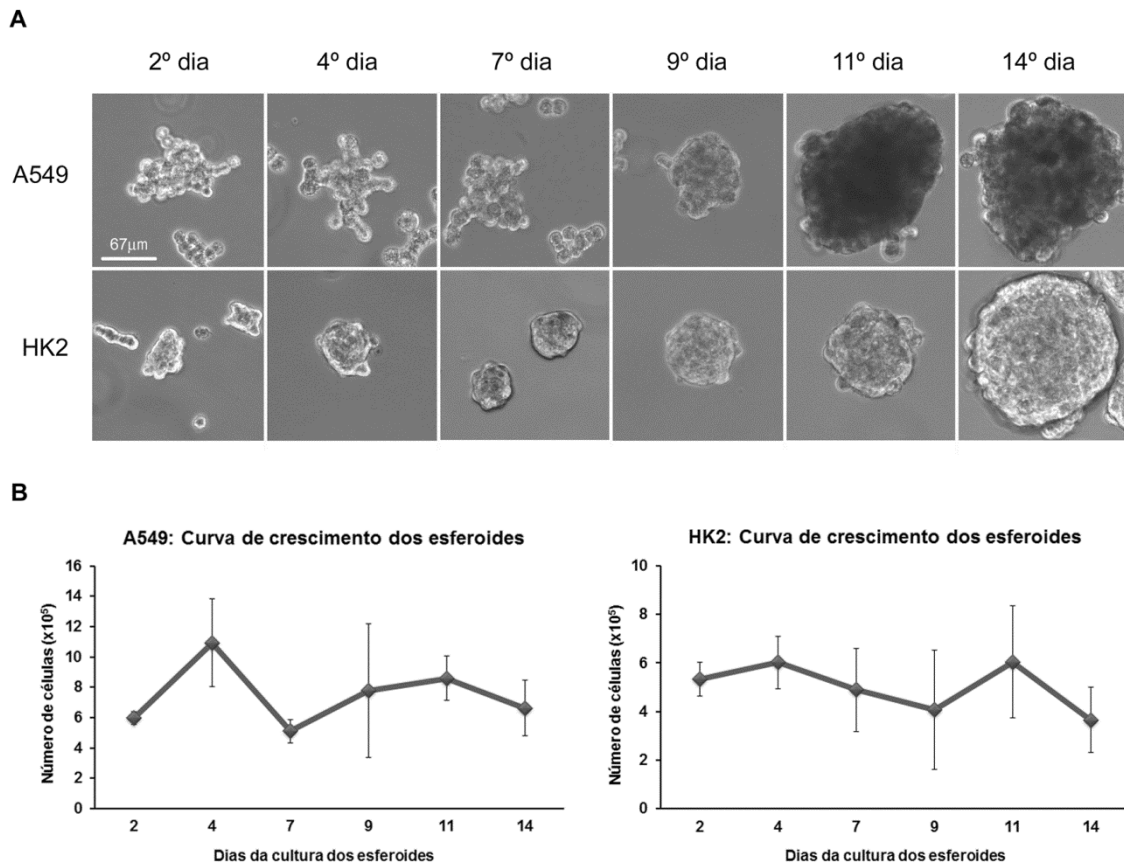


Figura 38 - Curva de crescimento das células dos esferoides formados pelas células A549 e HK2, cultivados por 14 dias. **A** - Imagens dos esferoides de ambas as linhagens nos dias de coleta para a realização da curva. A barra corresponde a 67 μm . **B** - Curvas de crescimento das células dos esferoides das linhagens A549 e HK2. O número de células se manteve constante durante todo o período da cultura 3D. O meio foi trocado nos dias em que a análise do número de células foi realizada. Barras = desvio padrão.

Em relação à análise do ciclo celular das células dos esferoides, pode-se observar que, em ambas as linhagens, houve um aumento na frequência de células em fase G1 ao longo do período da cultura (Figura 39). Os dados obtidos com a análise do ciclo celular corroboram os encontrados na curva de crescimento: o número de células se mantém constante em razão da maioria da população de células estar em G1.

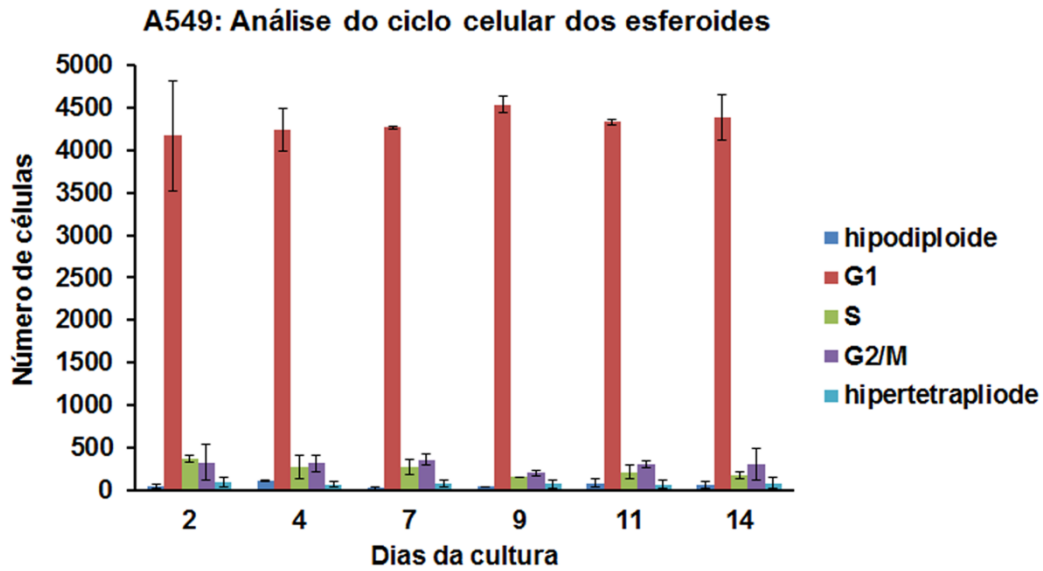
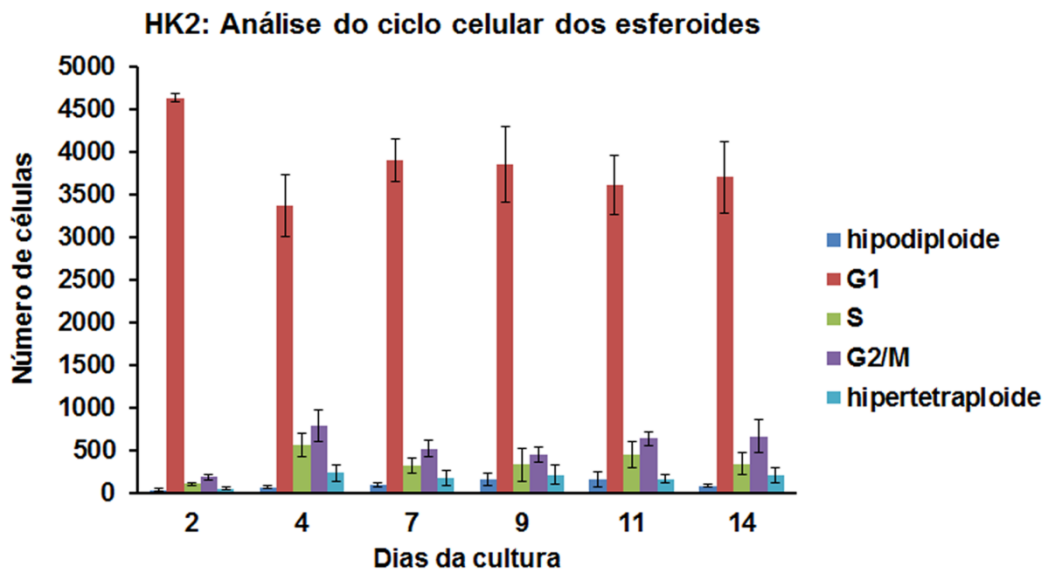
A**B**

Figura 39 - A frequência das células dos esferoides de ambas as linhagens foi maior na fase G1 do ciclo celular. **A** - Análise do ciclo celular dos esferoides formados pelas células A549. **B** - Análise do ciclo celular dos esferoides formados pelas células HK2. Foram quantificadas 5000 células de cada grupo. Barras = desvio padrão.

O perfil do ciclo celular observado nas células cultivadas em 3D foi diferente do observado nas células cultivadas na cultura 2D. As células da linhagem A549 cultivadas em monocamada apresentam em média 3171 células em G1 (Figura 40). Na cultura 3D, a média foi de 4321 células em G1 (Figura 39 A). As células da linhagem HK2 cultivadas em monocamada apresentaram em média 2365 células em G1 (Figura 40) e na cultura 3D essa média foi de 3840 células (Figura 39 B). A figura 41 mostra exemplos de histogramas gerados pelo citômetro, com a comparação do ciclo celular entre as células cultivadas na cultura 2D e as cultivadas na cultura 3D, ficando claro o aumento de células na fase G1 nos esferoides.

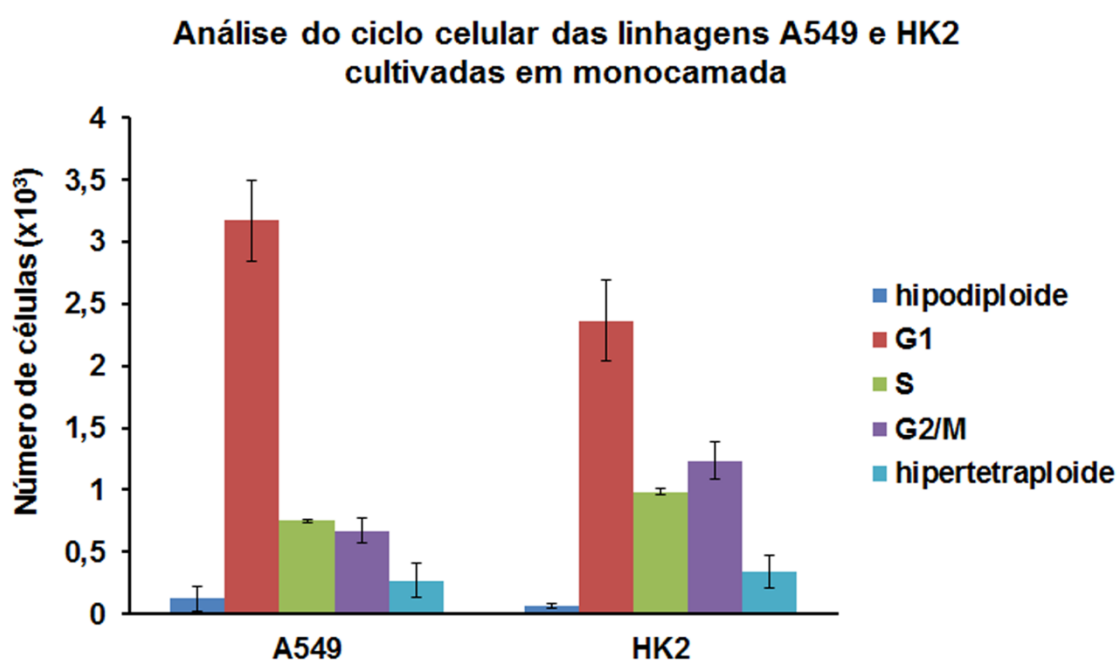


Figura 40 - Análise do ciclo celular das células A549 e HK2 cultivadas em monocamada (2D). Foram quantificadas 5000 células. Barras = desvio padrão.

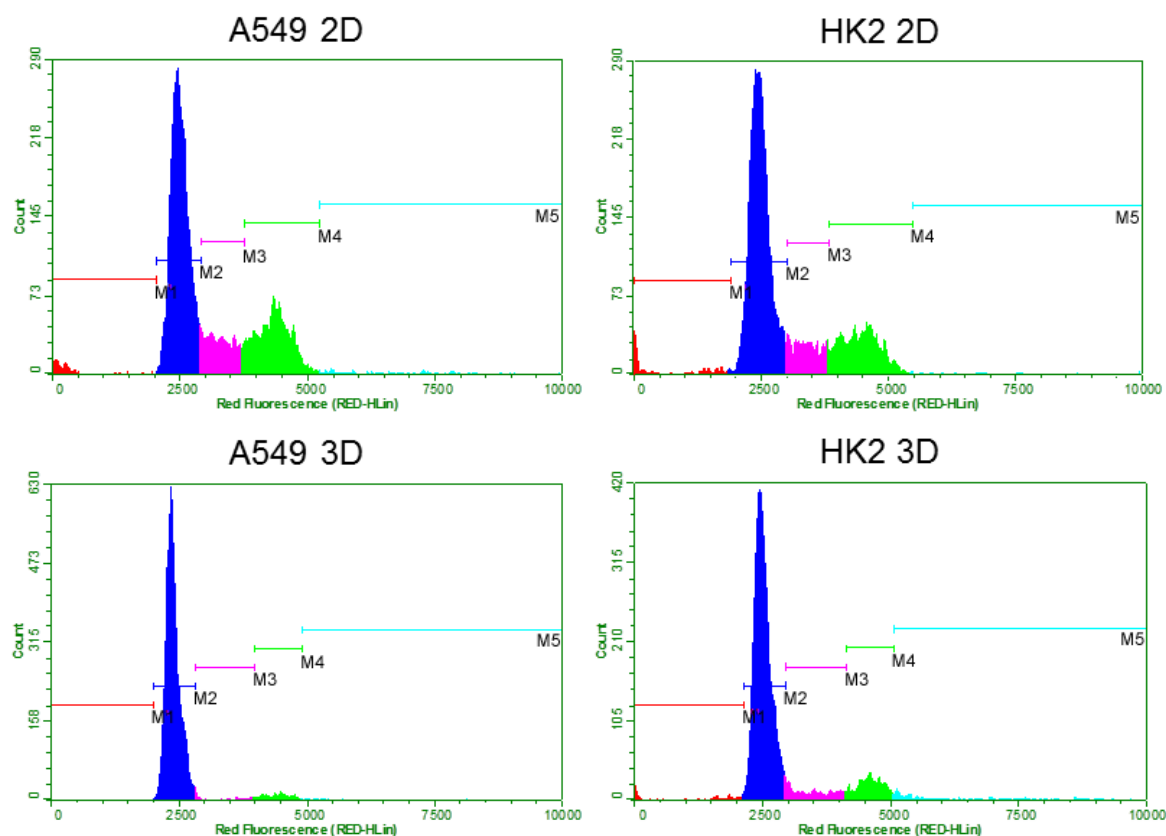


Figura 41 - Histogramas representativos da distribuição das fases do ciclo celular nas células A549 e HK2. As células foram cultivadas em monocamada (2D) e formando esferoides (3D). 5000 células foram analisadas. A cultura 3D apresentou aumento da fase G1 e diminuição da fase S e G2/M. M1 = hipodiploide, M2 = G1, M3 = S, M4 = G2/M, M5 = hipertetraploide.

A área de uma secção mediana de 30 esferoides foi avaliada após 7 e 14 dias de cultivo utilizando o software Zeiss LSM. As imagens adquiridas ao microscópio confocal de varredura a laser foram fundidas e cada esferoide foi contornado com um traçado e desta forma o software calculou a área e o perímetro dessas estruturas (Figura 42).

A medida da área dos esferoides foi heterogênea em ambos os períodos de cultura e em ambas as linhagens, assim a cultura apresentou esferoides de diversos tamanhos. Histogramas foram elaborados mostrando a distribuição das áreas encontradas nos períodos analisados (Figura 43). Pode-se observar que a área dos esferoides aumentou após 14 dias de cultivo, comparando-se com a área encontrada em 7 dias de cultivo. O aumento da área está de acordo com os resultados mostrados anteriormente (Figura 38 A).

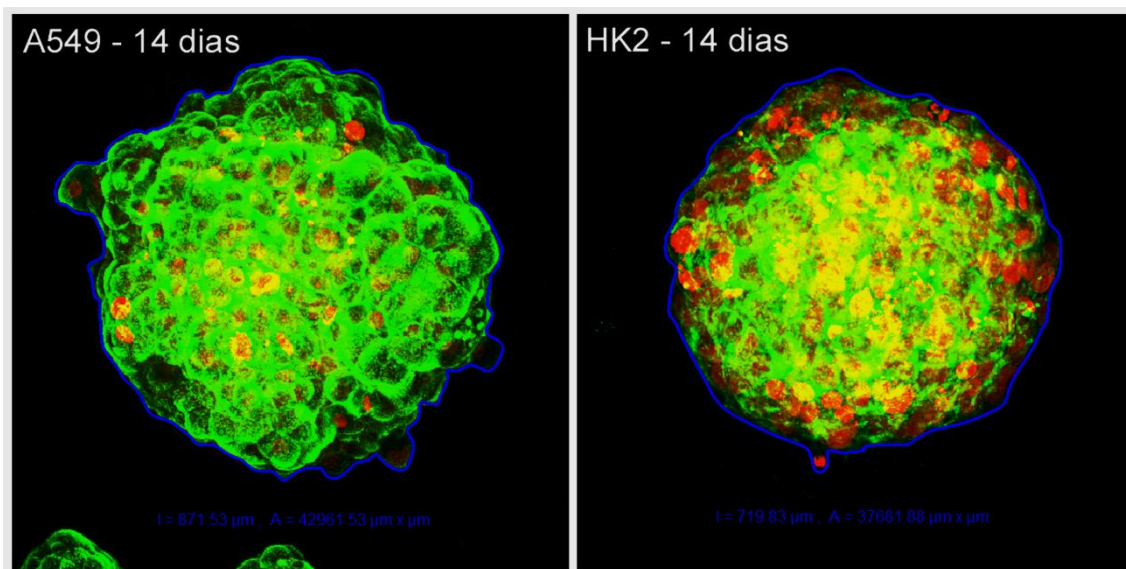


Figura 42 - Exemplo da medição da área de uma secção mediana dos esferoides formados pelas células das linhagens A549 e HK2. O contorno em azul mostra o traçado ao redor dos esferoides para a medição da área pelo software Zeiss LSM. Os microfilamentos de actina foram corados com faloidina-FITC e estão apresentados em verde e os núcleos, corados com iodeto de propídeo, em vermelho.

A maioria dos esferoides de 7 dias da linhagem A549 apresentaram área ente $1000 \mu\text{m}^2$ a $4000 \mu\text{m}^2$, mas também havia esferoides com áreas maiores. Após 14 dias de cultura, a maioria dos esferoides apresentou área maior que $20000 \mu\text{m}^2$ (Figura 43 A). Já a maioria dos esferoides de 7 dias formados pela linhagem HK2 apresentaram área entre $4001 \mu\text{m}^2$ a $8000 \mu\text{m}^2$ e também foram observados esferoides com áreas maiores. Após 14 dias de cultivo também foram encontrados esferoides com área maior que $20000 \mu\text{m}^2$ (Figura 43 B).

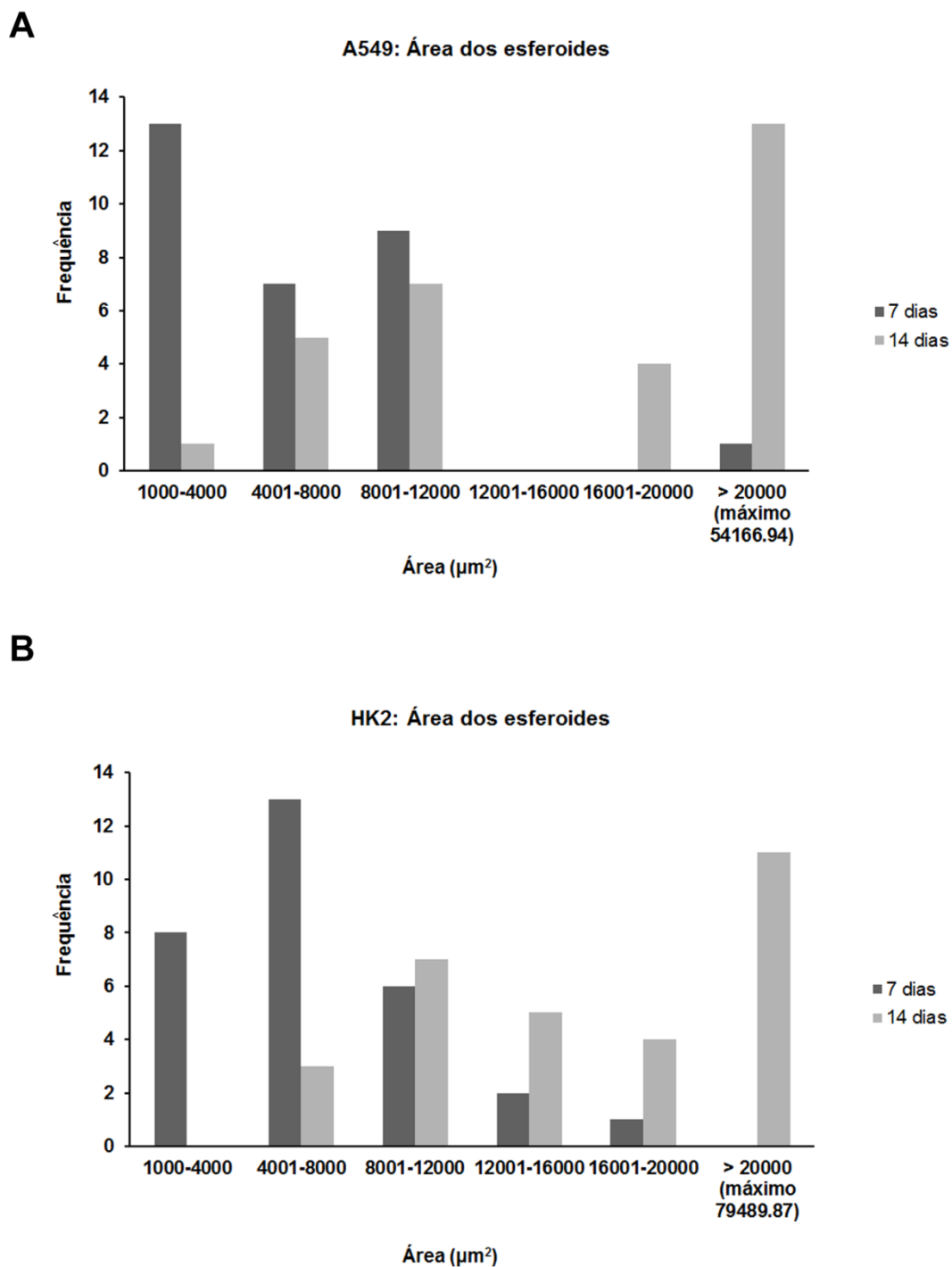


Figura 43 - Histogramas mostrando a distribuição da área dos esferoides após 7 e 14 dias em cultura. **A** - Área dos esferoides da linhagem A549. **B** - Área dos esferoides da linhagem HK2. Os esferoides formados por ambas as linhagens mostraram grande variabilidade de tamanho. A área dos esferoides aumentou após 14 dias em cultura.

4.2.9 NÍVEL DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS E RNAM NOS ESFEROIDES DAS LINHAGENS A549 E HK2

A expressão das proteínas EGFR, EGFR fosforilada (p-EGFR) e E-caderina foi investigada em lisados das células dos esferoides após 7 e 14 dias de cultivo pela técnica de *Western blotting* (Figura 44). O nível de expressão dessas proteínas também foi avaliado nas células cultivadas em monocamada (2D) para comparação com a cultura 3D.

Os esferoides formados pelas células da linhagem A549 apresentaram praticamente os mesmos níveis de expressão de EGFR (170 KDa) quando comparados com a expressão dessa proteína na cultura 2D. Foi possível detectar a forma fosforilada do EGFR (p-EGFR) nas células dos esferoides, mesmo sem a adição de EGF ao meio de cultura, demonstrando a ativação desse receptor na cultura 3D. Essa ativação de EGFR não foi detectada na linhagem A549 cultivada em monocamada sem a adição de EGF. Há um aumento na expressão de p-EGFR nos esferoides cultivados por 14 dias, quando comparada à expressão após 7 dias em cultura. A E-caderina é uma proteína importante na adesão célula-célula e seu nível de expressão aumentou significativamente na cultura 3D em relação à cultura 2D.

Os esferoides formados pela linhagem HK2 também apresentaram níveis de expressão de EGFR similares aos encontrados nas células cultivadas na cultura 2D. Pode-se afirmar, por meio da análise dos dados, que também houve aumento no nível de p-EGFR, comparando-se com o encontrado na cultura 2D. As células da linhagem HK2, cultivadas em monocamada, não expressam E-caderina, como visto anteriormente (Figura 26). Interessantemente, essas células, cultivadas na cultura 3D, continuam não expressando essa proteína importante para a adesão celular. Esse dado concorda com o observado na microscopia eletrônica de transmissão, que mostra a ausência de junções aderentes entre as células dos esferoides da linhagem HK2 e a presença de muitas protruções e dobras da membrana (Figura 37).

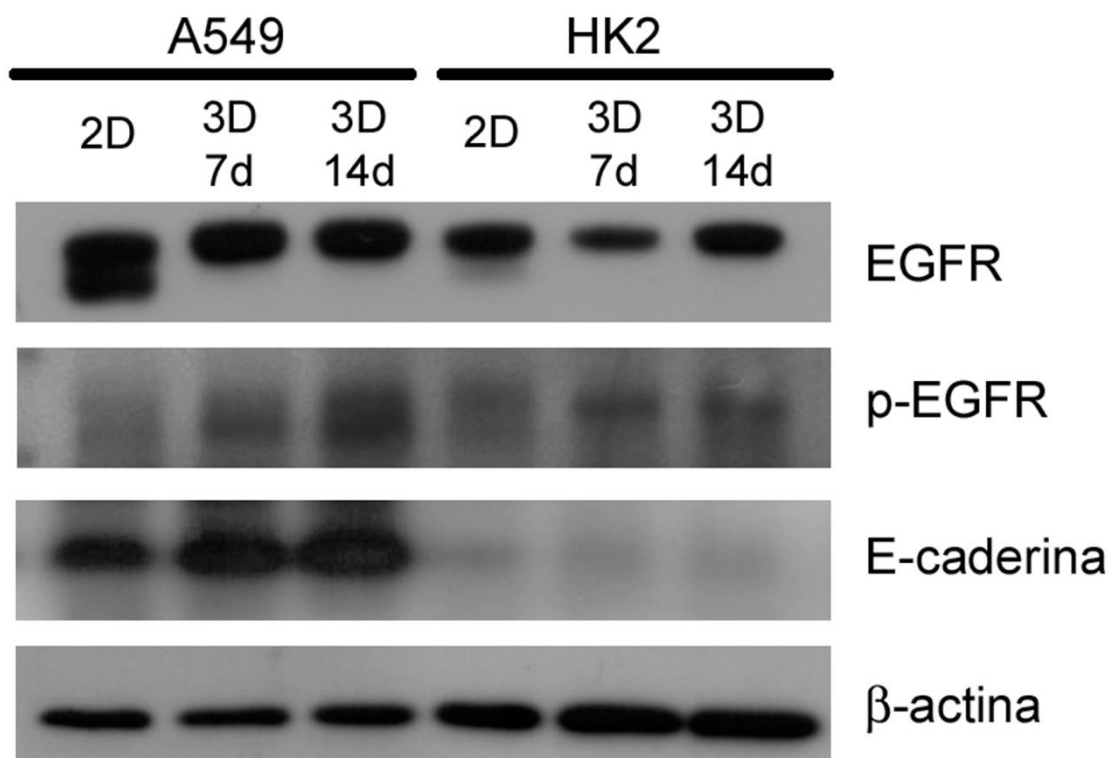


Figura 44 - Detecção da expressão de EGFR, p-EGFR, E-caderina pela técnica e *Western blotting* nas células da linhagem A549 e HK2 cultivadas em monocamada (2D) e na cultura 3D (esferoides). A actina foi utilizada como controle do carregamento do gel. O nível de expressão de EGFR foi similar ao encontrado na cultura 2D e foi detectada a presença de p-EGFR nos esferoides, sem estímulo com EGF. A expressão de E-caderina aumentou nos esferoides da linhagem A549, comparada com a expressão encontrada na cultura 2D, não sendo detectada nas células HK2.

Em suma, os resultados mostraram que os esferoides de ambas as linhagens expressam EGFR e apresentam aumento de p-EGFR, mostrando a presença de atividade desse receptor nesse tipo de cultura mesmo sem estímulo com EGF.

Os níveis de RNA mensageiro expressos pelos genes que codificam as proteínas supracitadas também foram avaliados utilizando-se, para tanto, a técnica de RT-PCR em tempo real (Figura 45). Os esferoides formados pelas células da linhagem A549 apresentaram praticamente o mesmo nível de expressão de RNAm para o EGFR comparados com células cultivadas em um modelo 2D, tanto em 7 como em 14 dias de cultivo. Já os esferoides formados pelas células da linhagem HK2 apresentam uma diminuição na expressão do RNAm para o EGFR em 14 dias de cultura, comparando-se com os resultados obtidos com as células cultivadas em monocamada.

Em relação ao RNAm para E-caderina, os esferoides formados pelas células da linhagem A549 não apresentaram variações significativas nos níveis de expressão do RNAm comparando-se com as células cultivadas em monocamada. Já os esferoides formados a partir das células HK2 tiveram um decréscimo na expressão do RNAm para E-caderina após 14 dias de cultivo, tendo como comparação a expressão avaliada nas culturas 2D.

A análise dos dados permitiu inferir que quanto maior o tempo em cultura dos esferoides, maiores são as chances de observação de características diferentes da monocamada. Assim, os experimentos seguintes, que tiveram como foco o estímulo celular pela adição de EGF ao meio de cultura, foram realizados com esferoides mantidos em cultura por 14 dias.

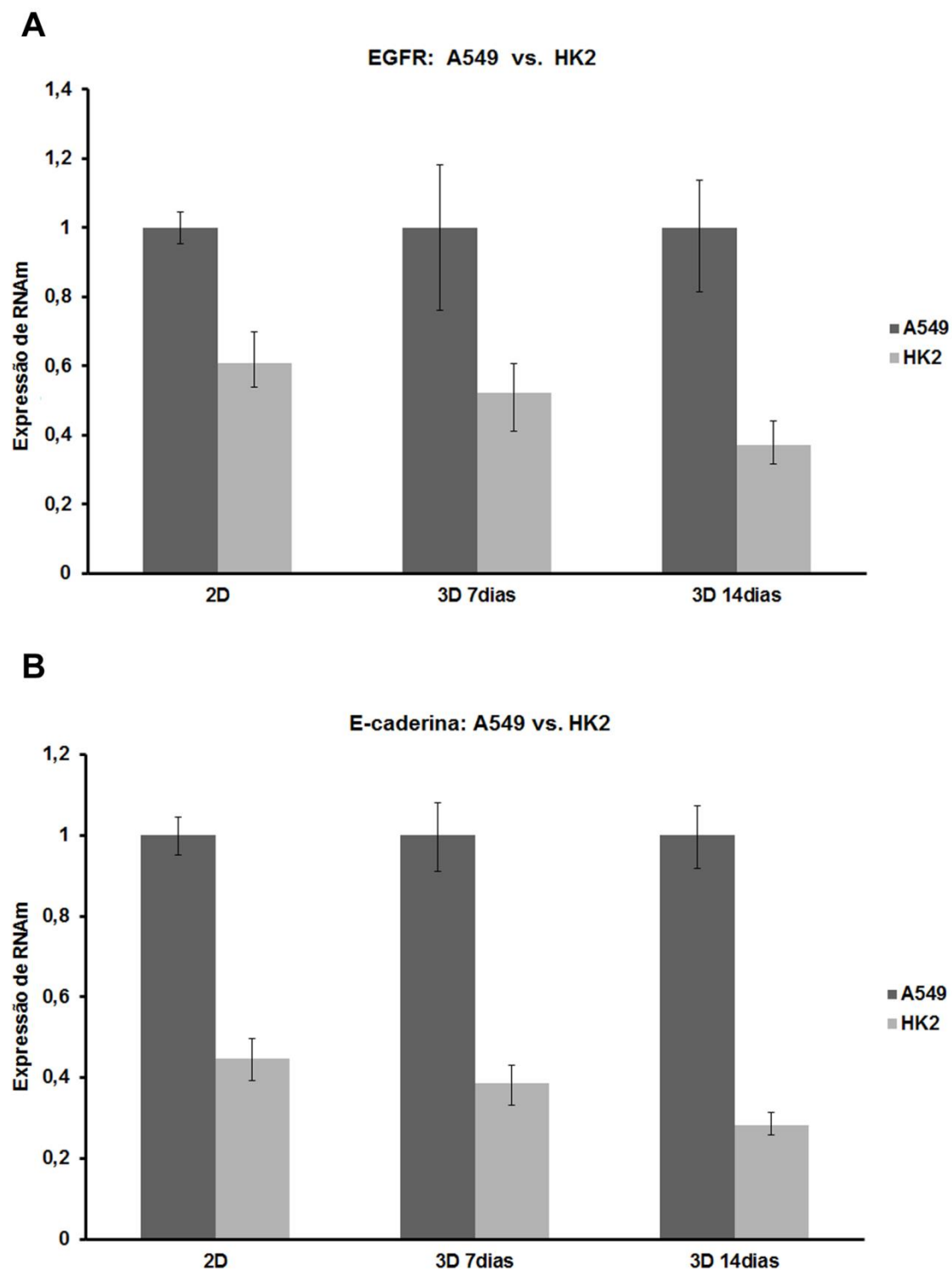


Figura 45 - Níveis de RNA mensageiro para as proteínas EGFR e E-caderina pelas células A549 e HK2 cultivadas em monocamadas (2D) e em esferoides (3D). **A** - Os níveis de EGFR são praticamente iguais na cultura 2D e 3D em ambas as linhagens. O nível de expressão é sempre maior na linhagem A549. **B** - Os níveis de RNAm permanecem iguais para ambas as linhagens cultivadas em 2D e em 3D. O nível de RNAm para a linhagem A549 também é maior do que o encontrado na linhagem HK2. Barras=desvio padrão.

4.3 EFEITOS DA ATIVAÇÃO DO EGFR POR EGF NAS CÉLULAS CULTIVADAS EM UM MODELO TRIDIMENSIONAL (ESFEROIDES)

4.3.1 O ESTÍMULO COM EGF NÃO PROMOVEU A PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS ESFEROIDES

A análise do perfil de expressão de EGFR nos esferoides mostrou que esse receptor é expresso na cultura 3D, apresentando-se ativado sem a adição de EGF ao meio de cultura. Visto que o estímulo com EGF promoveu migração e não proliferação nas células cultivadas em monocamada, seguiu-se a investigação desse estímulo na proliferação celular nos esferoides. Para isso, foi realizada a incorporação de BrdU nas células dos esferoides derivados de ambas as linhagens celulares para a marcação de células que se encontravam em fase S, bem como análise do ciclo celular dos esferoides por citometria de fluxo, após estímulo com EGF.

As concentrações de EGF e de AG1478 foram padronizadas para determinar se aquelas utilizadas nos experimentos com as células cultivadas em monocamada seriam as mesmas utilizadas com os esferoides. Os esferoides foram cultivados por 12 dias, a concentração de SFB no meio foi diminuída para 2,5% e foram adicionados à cultura 100 ng/ml de EGF. Para o grupo tratado com AG1478, essa droga foi adicionada 1 hora antes do estímulo com EGF. Utilizou-se a mesma concentração de AG1478 usada nos experimentos em monocamada (5 μ M) e o dobro dessa concentração (10 μ M). O grupo controle foi cultivado somente com meio suplementado com 2,5% de SFB. Os esferoides foram cultivados nessas condições por 48 horas, sendo lisados para a realização de *Western blotting* (Figura 46).

A presença de p-EGFR foi detectada no lisado das células dos esferoides de ambas as linhagens após estímulo com EGF. O estímulo com EGF causou grande aumento do p-EGFR e o foi necessário diminuir o tempo da exposição do filme, prejudicando a detecção de bandas mais fracas; talvez por esse motivo não foram observadas bandas correspondentes ao p-EGFR nos grupos controle. A detecção de p-EGFR pelos esferoides, sem estímulo com EGF, pode ser verificada na figura 44. O AG1478 inibiu a ativação de EGFR, pois não foi detectado p-EGFR na presença dessa droga. A concentração de 10 μ M foi mais eficiente, pois em algumas repetições foi possível detectar bandas de p-EGFR na presença de 5 μ M de AG1478.

A expressão de EGFR se manteve constante em todos os grupos de tratamento na linhagem A549. Na linhagem HK2, foi detectado um decréscimo na expressão de EGFR no grupo estimulado por EGF. Esses resultados com o EGFR são similares ao encontrado com a cultura de células em monocamada (Figura 14 B).

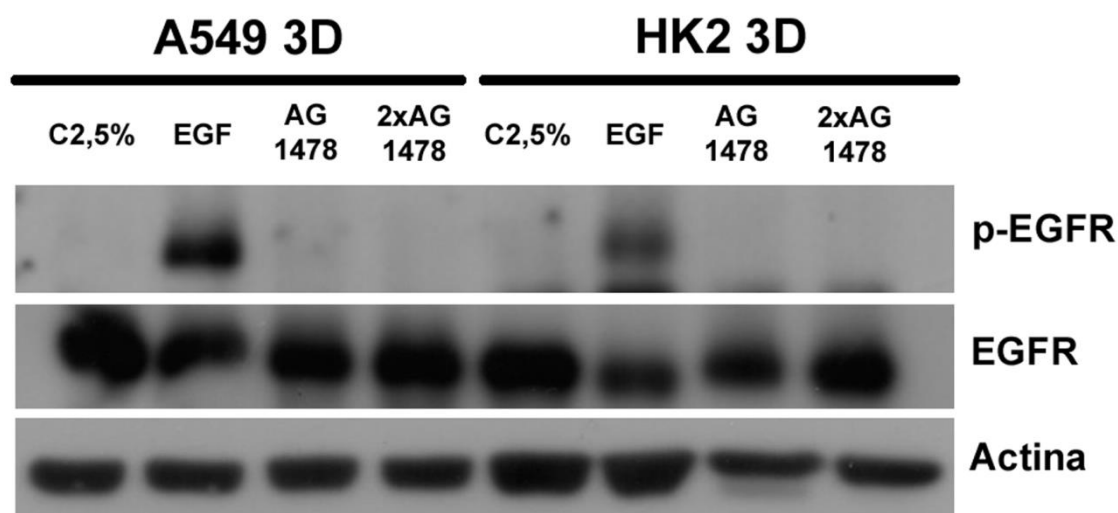


Figura 46 - Detecção de p-EGFR e EGFR nos esferoides das linhagens A549 e HK2 após estímulo com EGF e inibição com AG1478 por *Western blotting*. O AG1478 (5 μ M ou 10 μ M) foi adicionado 1 hora antes da adição do EGF (100 ng/mL). Os grupos experimentais foram: C2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF, 2,5% SFB + AG1478 (5 μ M) + EGF e 2,5% SFB + AG1478 (10 μ M) + EGF (2xAG1478). A actina foi utilizada como controle do carregamento do gel. O estímulo com EGF induziu a fosforilação do EGFR em ambas as linhagens. O tratamento com AG1478 inibiu a ativação do EGFR.

Os efeitos do estímulo com EGF na proliferação celular dos esferoides foram avaliados pela incorporação com BrdU. Os esferoides foram cultivados por 12 dias e então foi adicionado EGF ou AG1478, sendo mantidos nessa condição por 48 horas. Os grupos utilizados para a realização desse experimento foram: C10% SFB, C2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF e 2,5% SFB + AG1478. As células dos esferoides da linhagem A549 praticamente mantiveram o mesmo número de células em fase S em todos os grupos de tratamento (Figura 47 A). As células dos esferoides da linhagem HK2 também não aumentaram a quantidade de células em fase S após estímulo com EGF (Figura 47 B). O estímulo com EGF e a inibição por AG1478 não alteraram a frequência de células em fase S, não havendo interferência na proliferação celular (Figura 47).

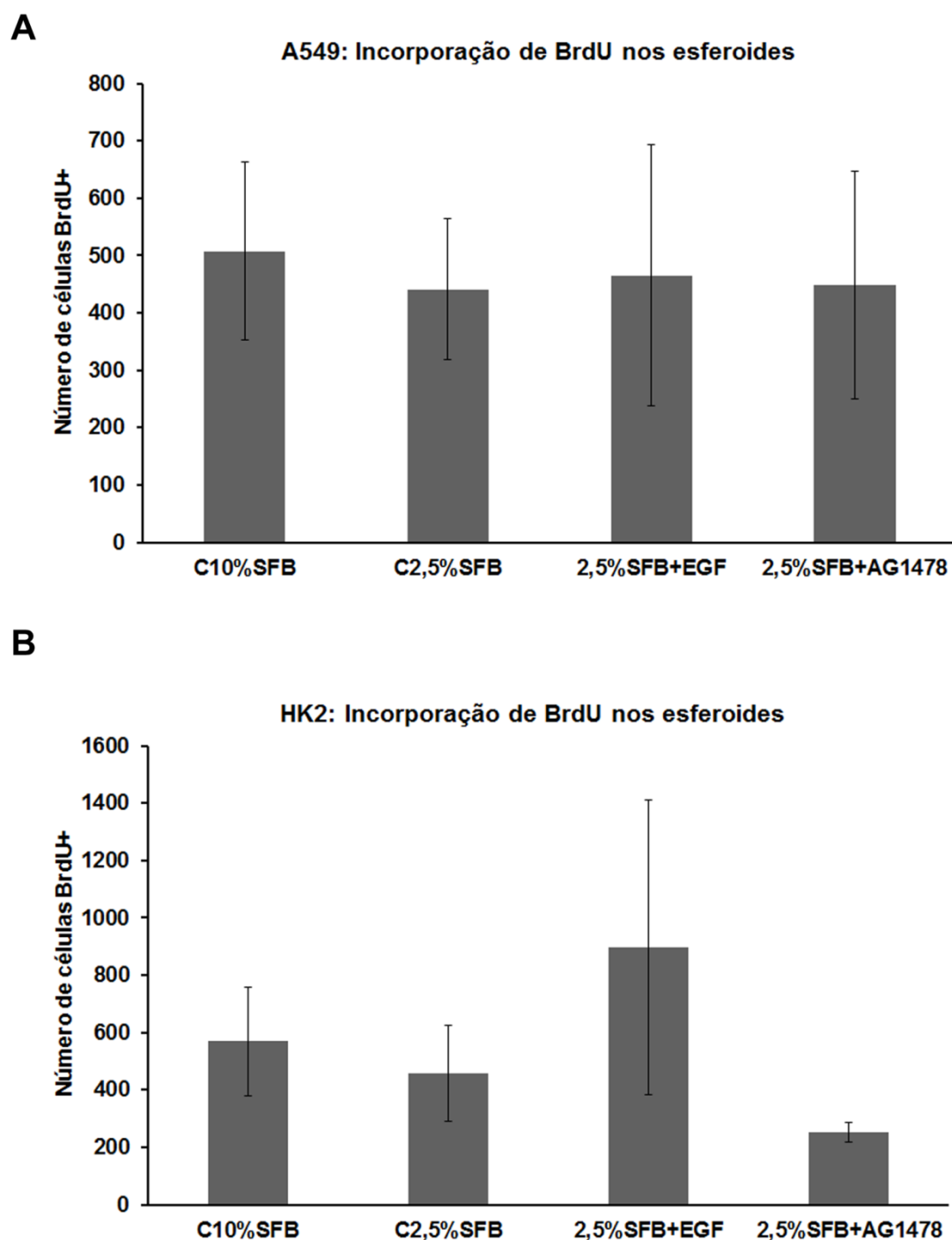


Figura 47 - Gráficos mostrando a frequência de células em fase S nos esferoides. **A** - Número de células com a marcação para BrdU nas células dos esferoides formados pela linhagem A549. **B** - Número de células com a marcação para BrdU nas células dos esferoides formados pela linhagem HK2. O estímulo com EGF e a inibição por AG1478 não afetaram o número de células na fase S, comparando-se com os controles (C10% SFB e C2,5% SFB). Barras = desvio padrão.

A análise do ciclo celular das células dos esferoides, estimuladas com EGF ou inibidas com AG1478, também foi realizada após 14 dias de cultivo. Os grupos de tratamento foram os mesmos utilizados no experimento de incorporação com BrdU: C10% SFB, C2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF e 2,5% SFB + AG1478.

O número de células dos esferoides da linhagem A549 se manteve constante nas diferentes fases do ciclo celular entre os grupos de tratamento (Figura 48 A). Desta forma, o EGF e o AG1478 não promoveram alterações nas fases do ciclo celular dos esferoides da linhagem A549. O histograma que apresenta os dados dos esferoides da linhagem HK2 (Figura 48 B) mostra que os esferoides estimulados com EGF apresentam um discreto aumento do número de células na fase S e em G2/M, comparando-se com os outros grupos de tratamento. Entretanto, os testes estatísticos mostraram que essa alteração não é significativa. O EGF e o AG1478 também não promoveram alterações no ciclo celular dos esferoides da linhagem HK2.

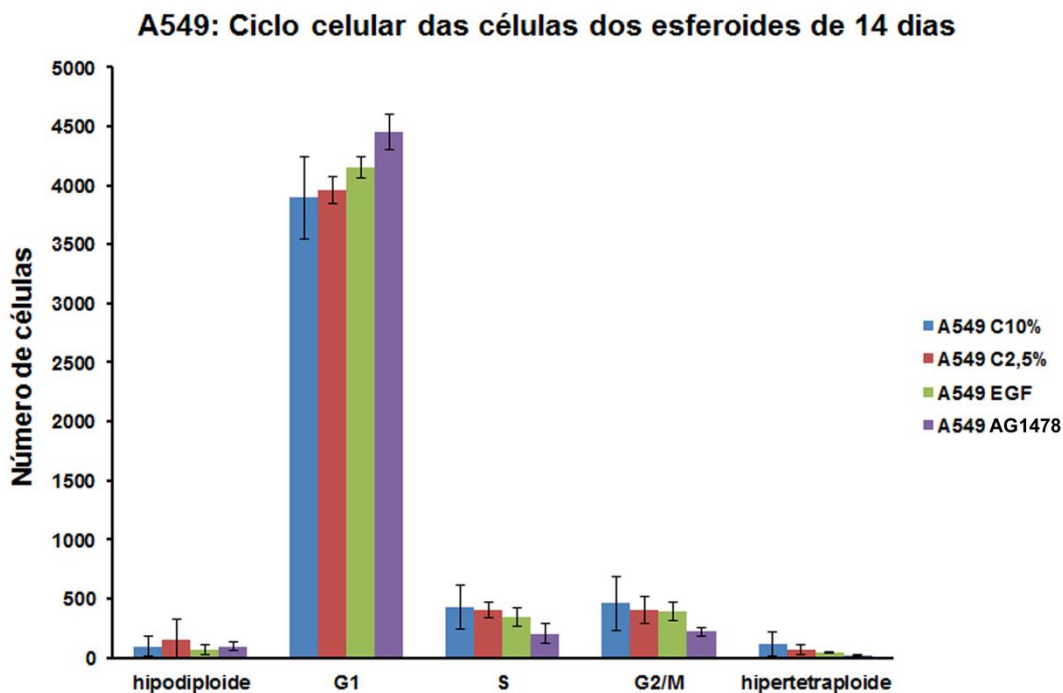
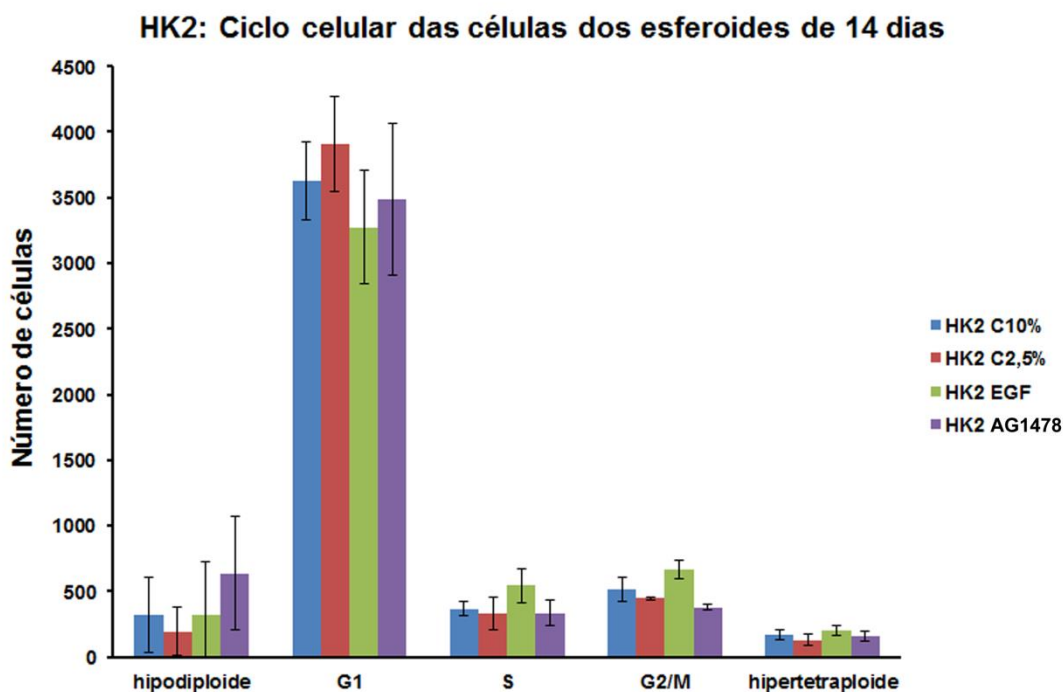
A**B**

Figura 48 - Histogramas mostrando que o EGF e o AG1478 não interferiram nas fases do ciclo celular das células dos esferoides das linhagens A549 e HK2. **A** - Análise do ciclo celular nas células dos esferoides da linhagem A549. **B** - Análise do ciclo celular nas células dos esferoides da linhagem HK2. Barras = desvio padrão.

4.3.2 EXPRESSÃO DE P-ERK E P-AKT NOS ESFEROIDES E NA CULTURA EM MONOCAMADA DAS LINHAGENS A549 E HK2

A ativação do EGFR promove a fosforilação de moléculas de diversas vias de sinalização citoplasmática, como a fosforilação de ERK e Akt. A ativação de ERK está relacionada com a regulação da transcrição de moléculas ligadas à proliferação celular. Já a ativação de Akt é responsável pela manutenção da sobrevivência celular. A expressão de ERK, p-ERK, Akt e p-Akt foi avaliada nas células das linhagens A549 e HK2, cultivadas em monocamada e nos esferoides.

A figura 49 mostra os resultados da detecção dessas proteínas obtidos com a cultura das células em monocamada. Os grupos experimentais foram: C2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF e 2,5% SFB + AG1478 + EGF. O estímulo com EGF promoveu o aumento da presença de p-ERK em ambas as linhagens. Entretanto, mesmo com o aumento da expressão dessa proteína relacionada à proliferação celular, não foi observado aumento da proliferação nas células estimuladas com EGF, cultivadas em monocamada. O estímulo com EGF não alterou a expressão de p-Akt. A inibição com AG1478 causou diminuição dos níveis de p-ERK e de p-Akt nas duas linhagens.

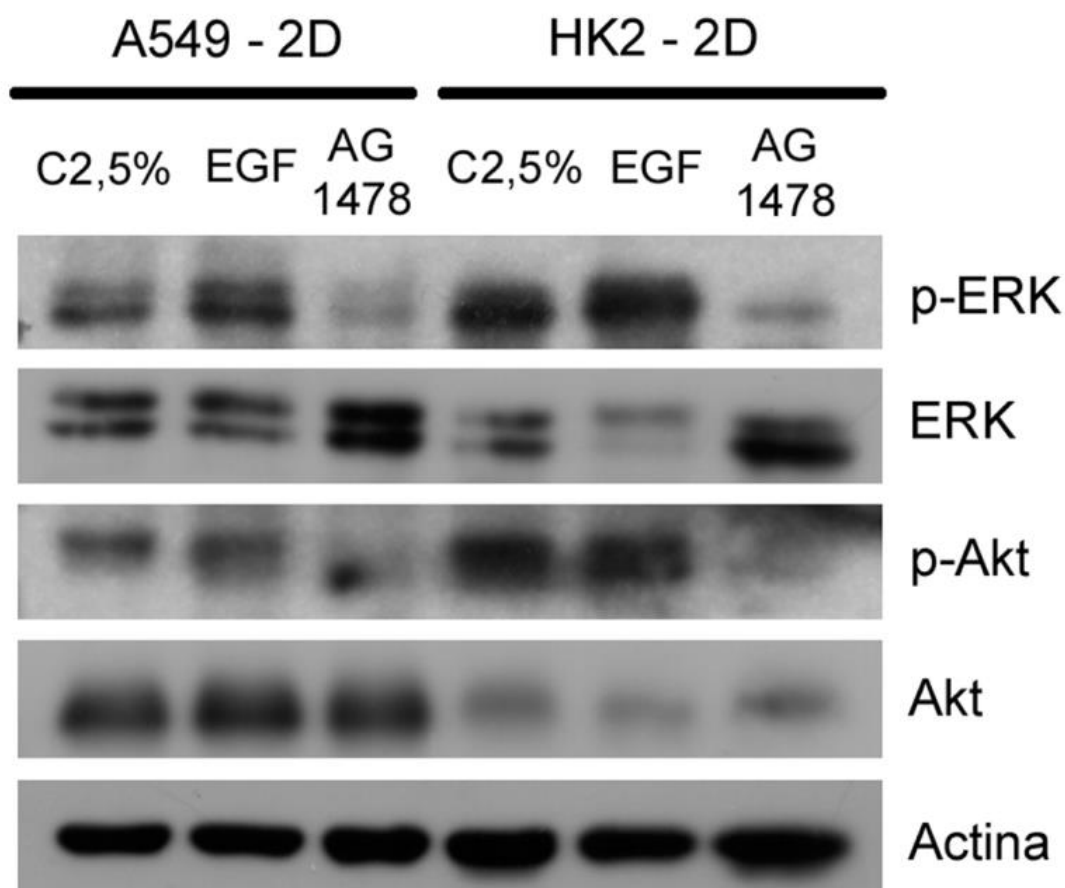


Figura 49 - Detecção dos níveis de p-ERK e p-Akt pelas células A549 e HK2 cultivadas em monocamada, utilizando a técnica *Western blotting*. Os grupos experimentais foram: C2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF e 2,5% SFB + AG1478 + EGF. O estímulo com EGF causou o aumento dos níveis de p-ERK e a inibição com AG1478 induziu diminuição dos níveis de p-ERK e p-Akt, em ambas as linhagens. A actina foi utilizada como controle do carregamento do gel.

A figura 50 mostra a detecção das proteínas p-ERK e p-Akt nas células dos esferoides das linhagens A549 e HK2. Os grupos experimentais foram: C2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF, 2,5% SFB + AG1478 (5 μ M) + EGF e 2,5% SFB + AG1478 (10 μ M) + EGF. O estímulo com EGF causou aumento de p-ERK e de p-Akt somente nos esferoides da linhagem HK2. O aumento da ERK não promoveu a proliferação celular. A inibição com AG1478 promoveu a diminuição somente de p-ERK nos esferoides formados pelas duas linhagens.

O estímulo com EGF promoveu diferentes respostas em relação à expressão de p-ERK e p-Akt nas culturas 2D e 3D. A linhagem A549 cultivada em monocamada apresentou aumento de p-ERK após estímulo com EGF, aumento não observado no cultivo 3D. A linhagem HK2 cultivada em monocamada também apresentou aumento de p-ERK após estímulo com EGF e a cultura 3D apresentou aumento de p-ERK e de p-Akt.

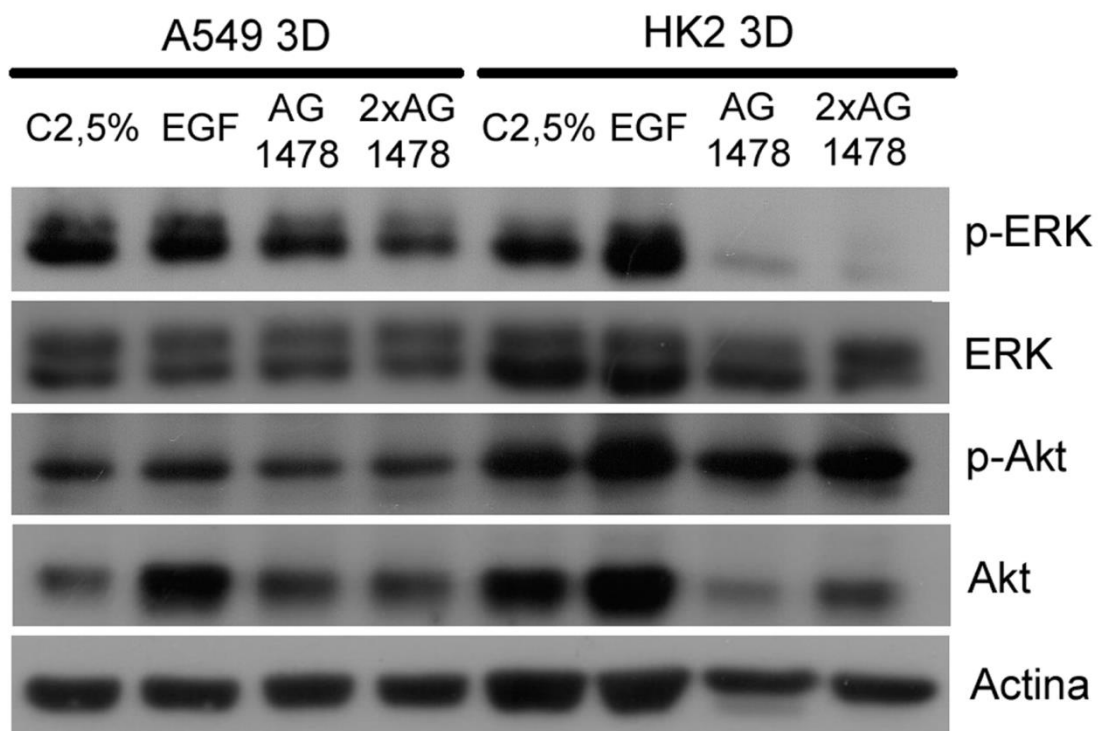


Figura 50 - Detecção dos níveis de p-ERK e p-Akt pelos esferoides das linhagens A549 e HK2, utilizando a técnica *Western blotting*. Os grupos experimentais foram: C2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF, 2,5% SFB + AG1478 (5 μ M) + EGF e 2,5% SFB + AG1478 (10 μ M) + EGF. O estímulo com EGF promoveu o aumento dos níveis de p-ERK e p-Akt somente nos esferoides da linhagem HK2. A inibição com AG1478 causou a diminuição de p-ERK nos esferoides de ambas as linhagens.

4.3.3 O ESTÍMULO COM EGF CAUSOU ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NOS ESFEROIDES DA LINHAGEM A549

O estímulo com EGF não induziu a proliferação celular nos esferoides das linhagens A549 e HK2, mesmo com o aumento dos níveis de p-ERK detectado nos esferoides da linhagem HK2. A análise das imagens dos esferoides, antes da dissociação por tripsina (BrdU/ciclo celular) ou lisados (*Western blotting*), mostrou que o estímulo com EGF provocava alterações na morfologia dos esferoides. A figura 51 mostra esferoides de ambas as linhagens cultivados por 12 dias e mantidos por 48 horas na presença de 2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF, 2,5% SFB + AG1478 + EGF. O AG1478 (10 μ M) foi adicionado à cultura 1 hora antes da adição de EGF.

Os esferoides da linhagem A549 estimulados com EGF deixaram de formar esferas, voltando a ter formato similar a um “cacho de uva”, forma observada somente no início da cultura 3D. Essa alteração morfológica desaparece quando é adicionado AG1478. Essa alteração morfológica não foi observada nos esferoides formados pela linhagem HK2.

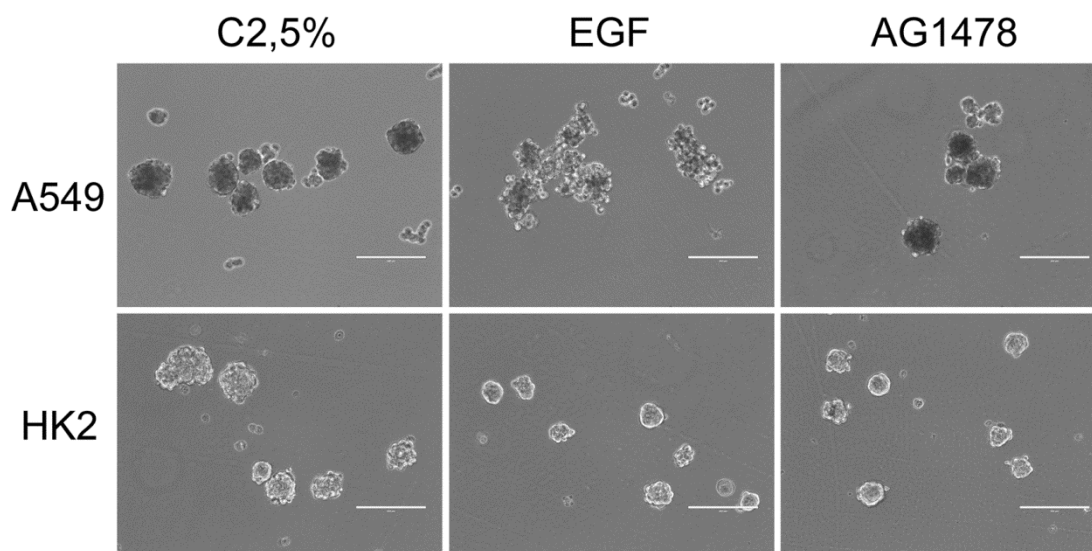


Figura 51 - Alteração da morfologia dos esferoides da linhagem A549 causada pelo estímulo com EGF. Os esferoides foram cultivados por 12 dias e foi adicionado EGF ou AG1478 (10 μ M) + EGF. O grupo controle foi mantido com 2,5% SFB. Após 48 horas de tratamento, observaram-se alterações morfológicas nos esferoides da linhagem A549. Não houve alteração nos esferoides da linhagem HK2. As barras correspondem a 200 μ m.

Os esferoides de ambas as linhagens foram lisados conforme a metodologia já descrita, após 48 horas de tratamento com EGF ou AG1478 (10 μ M) + EGF, e os níveis de expressão de E-caderina foram detectados pela técnica de *Western blotting* (Figura 52). A detecção de E-caderina foi realizada a fim de investigar se a alteração morfológica dos esferoides da linhagem A549, observada após estímulo com EGF, seria devido à perda de adesão entre as células. A expressão de E-caderina foi similar em todos os grupos de tratamento dos esferoides da linhagem A549. As células dos esferoides da linhagem HK2 não expressam E-caderina, como já descrito anteriormente.

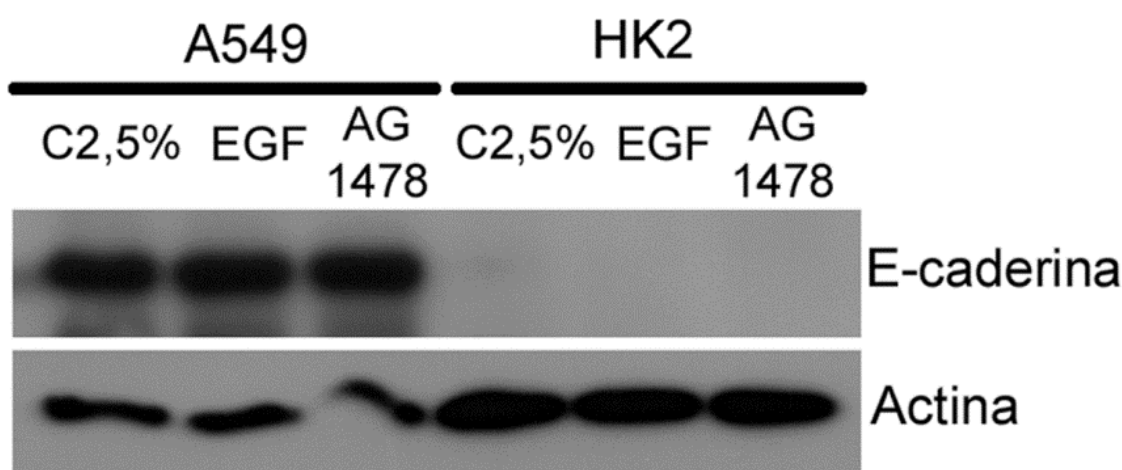


Figura 52 - Detecção de E-caderina pela técnica de *Western blotting* nos esferoides estimulados com EGF ou inibidos com AG1478. Os esferoides foram cultivados por 12 dias e foi então adicionado a cultura 2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF ou 2,5% SFB + AG1478 + EGF. O AG1478 (10 μ M) foi adicionado à cultura 1 hora antes da adição de EGF. Não houve alteração na expressão de E-caderina nos esferoides da linhagem A549. A linhagem HK2 não expressa E-caderina.

4.4 INVESTIGAÇÃO DAS POSSÍVEIS VIAS DE SINALIZAÇÃO CITOPLASMÁTICAS, ENVOLVIDAS COM A MIGRAÇÃO CELULAR E ATIVADAS PELA VIA EGF-EGFR, NAS CULTURAS EM MONOCAMADA E NOS ESFEROIDES

O estímulo com EGF promoveu alterações na morfologia das células cultivadas em monocamada, causando aumento da migração celular. Alterações morfológicas também foram detectadas nos esferoides da linhagem A549 estimuladas com EGF. O próximo passo foi investigar se o estímulo com EGF poderia estar relacionado com a ativação da migração celular nos esferoides, já que não teve efeitos na proliferação. Também foi foco investigar a via de sinalização citoplasmática relacionada com a migração das células cultivadas em monocamada e nos esferoides, utilizando inibidores para as proteínas p-ERK ou p-Akt.

A inibição de p-ERK foi feita utilizando o inibidor U0126 na concentração de 10 μM e o inibidor LY294002 foi utilizado para inibir p-Akt na concentração de 30 μM . Essas concentrações foram baseadas em trabalhos científicos realizados com a linhagem A549 e foram testadas para a linhagem HK2. As células das linhagens A549 e HK2 foram cultivadas em monocamada na presença dos inibidores e EGF por 48 horas. Os grupos de tratamento utilizados foram: controles (C2,5% SFB, DMSO, DMSO + EGF), U0126 + EGF e LY294002 + EGF. Todos os grupos experimentais foram cultivados com meio suplementado com 2,5% SFB. O DMSO foi utilizado como controle, pois ele é utilizado na diluição dos inibidores. Os inibidores foram adicionados 1 hora antes da adição do EGF.

Os níveis de p-ERK e p-Akt após tratamento com os inibidores foram detectados por *Western blotting*. Os inibidores, nas concentrações citadas acima, foram eficazes e específicos em ambas as linhagens (Figura 53). U0126 impediu a fosforilação de ERK, detectada pela ausência da banda de p-ERK, nas duas linhagens. LY294002 impediu a fosforilação de Akt, detectada pela ausência da banda p-Akt, também nas duas linhagens.

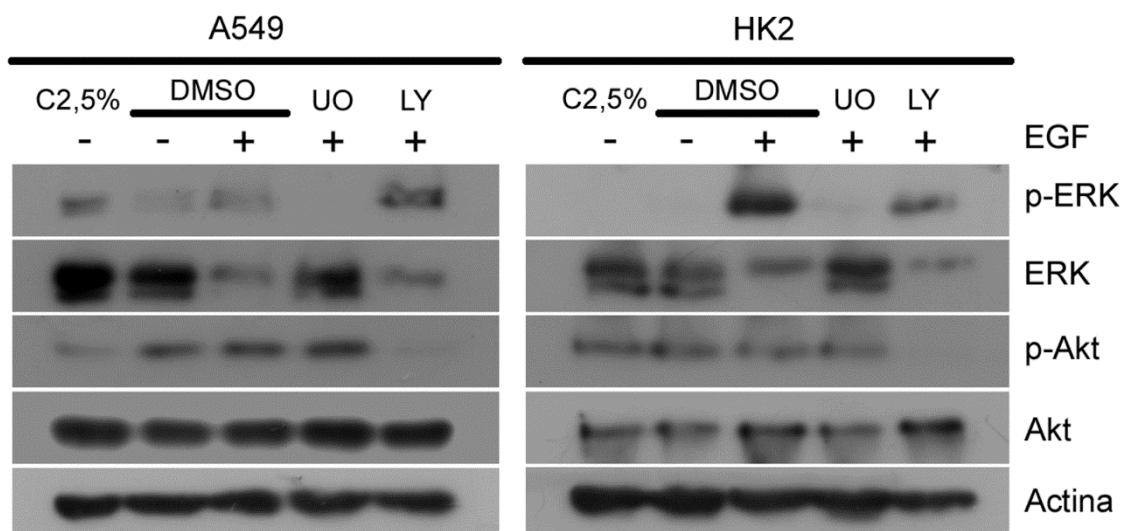


Figura 53 - Inibição de p-ERK e de p-Akt nas linhagens A549 e HK2, cultivadas em monocamada. U0126 (10 μ M) e LY294002 (30 μ M) inibiram a expressão de p-ERK e p-Akt, respectivamente. O DMSO foi utilizado como controle devido ao fato de ser utilizado na diluição dos inibidores. A actina foi utilizada como controle do carregamento do gel.

O ensaio de ferida foi realizado novamente nas células A549 e HK2 cultivadas em monocamada, com a adição de grupos contendo os inibidores U0126 e LY204002 (Figura 54 e 55). Os grupos foram: DMSO, DMSO + EGF, U0126 + EGF e LY294002 + EGF, cultivados em meio suplementado com 2,5% SFB. As células da linhagem A549 migraram e fecharam a ferida mais rapidamente no grupo estimulado com EGF (DMSO + EGF) em comparação com o grupo controle (DMSO) (Figura 54 A). Após 24 horas de estímulo com EGF, a área da ferida apresentava com muito mais células comparando-se com os outros grupos. Após 48 horas de estímulo com EGF, a ferida estava completamente preenchida pelas células, enquanto nos outros grupos ainda era possível detectar espaços sem células. Os dois inibidores causaram diminuição da migração das células, inibindo os efeitos do estímulo com EGF. Resultados similares foram obtidos com a linhagem HK2: o estímulo com EGF promoveu a migração celular, sendo que após 48 horas, a ferida do grupo DMSO + EGF estava com uma concentração maior de células fechando a ferida comparando-se com os outros grupos (Figura 54 B).

As áreas das feridas foram quantificadas e histogramas foram construídos representando a área recuperada, recoberta pelas células, após 24 e 48 horas de tratamento

(Figura 55). A linhagem A549 estimulada com EGF recuperou totalmente a ferida após 48 horas, ponto em que a ferida já estava 100% recoberta pelas células. O grupo controle (DMSO) e o UO+EGF recuperaram cerca de 70% da ferida e o LY+EGF recuperou 58% da ferida (Figura 55 A). Após 48 horas de estímulo com EGF, as células da linhagem HK2 recuperaram 60% da ferida. O grupo controle (DMSO) recuperou 44%, o grupo UO + EGF 32% e o LY + EGF somente 27% (Figura 55 B). A diminuição da migração detectada no grupo LY + EGF, quando comparado com o grupo experimental DMSO + EGF, em 24 e 48 horas, foi estatisticamente significativa.

Resumindo, o EGF estimulou as células a fecharem a ferida rapidamente, comparando-se com os outros grupos. Os inibidores de p-Akt e de p-ERK diminuíram a migração induzida pelo EGF. Os efeitos causados pelo EGF na migração celular das células HK2 são dependentes da ativação de Akt, uma vez que a inibição de p-Akt impediu a migração celular estimulada pela ativação do EGFR por EGF.

A análise dos efeitos do EGF na migração das células dos esferoides foi realizada pelo método de migração de esferoide (*Spheroid Migration Assay*). Os esferoides foram cultivados por 13 dias e foram transferidos a placas de 35 mm com tratamento para a adesão celular, mantidos em estufa por 24 horas e sem rotação. Os grupos de tratamento foram: C10% SFB, C2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF, 2,5% SFB + AG1478 + EGF, 2,5% SFB + U0126 + EGF e 2,5% SFB + LY294002 + EGF. Os esferoides aderiram às placas e as células começaram a migrar de forma centrífuga para fora dos esferoides (Figura 56).

As células dos esferoides da linhagem A549 estimuladas com EGF migraram mais quando comparadas com os outros grupos. Em todos os outros grupos foi possível observar um agrupamento de células no centro do que restou de cada esferoide, com as células migrando ao redor. No grupo estimulado com EGF a dissociação dos esferoides foi completa devido à migração das células.

As células dos esferoides da linhagem HK2 não migraram tanto quanto as da linhagem A549. Os esferoides aderiram à placa e todos os grupos apresentaram poucas células migrando ao redor de cada esferoide aderido.

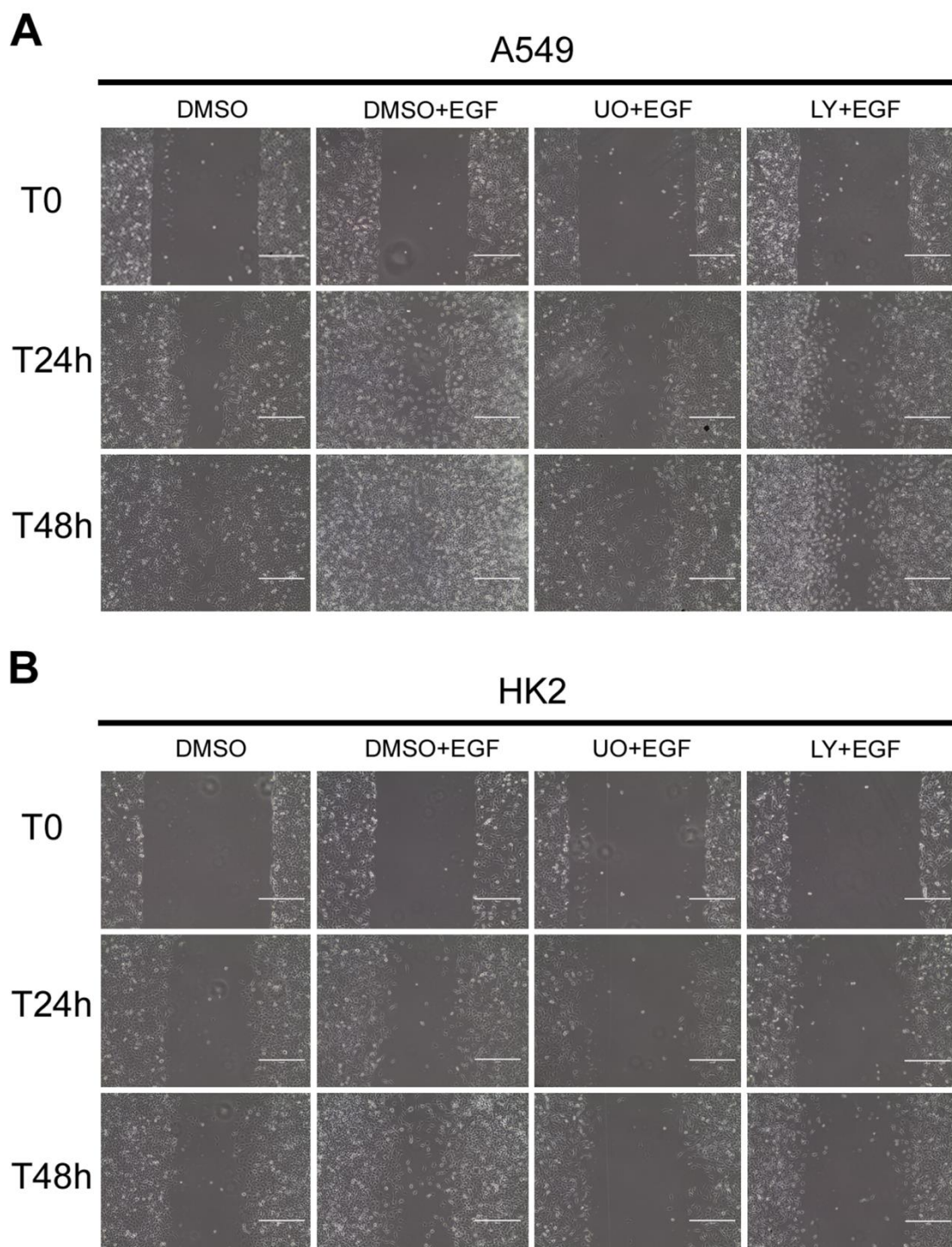


Figura 54 - Ensaio de ferida com as linhagens A549 e HK2 evidenciando a migração celular estimulada pelo EGF e o envolvimento de p-ERK e p-Akt nesse processo. As células foram tratadas com U0126 (inibidor de p-ERK) e LY294002 (inibidor de p-Akt) 1 hora antes da incubação com EGF. O DMSO, utilizado na diluição das drogas, foi adicionado às células controle. As células foram mantidas por 48 horas com DMSO, DMSO + EGF, U0126 + EGF e LY204002 + EGF, na presença de 2,5% SFB. **A** - Imagens representativas do fechamento da ferida pelas células A549. **B** - Imagens representativas do fechamento da ferida pelas células HK2. As barras correspondem a 200 μ m.

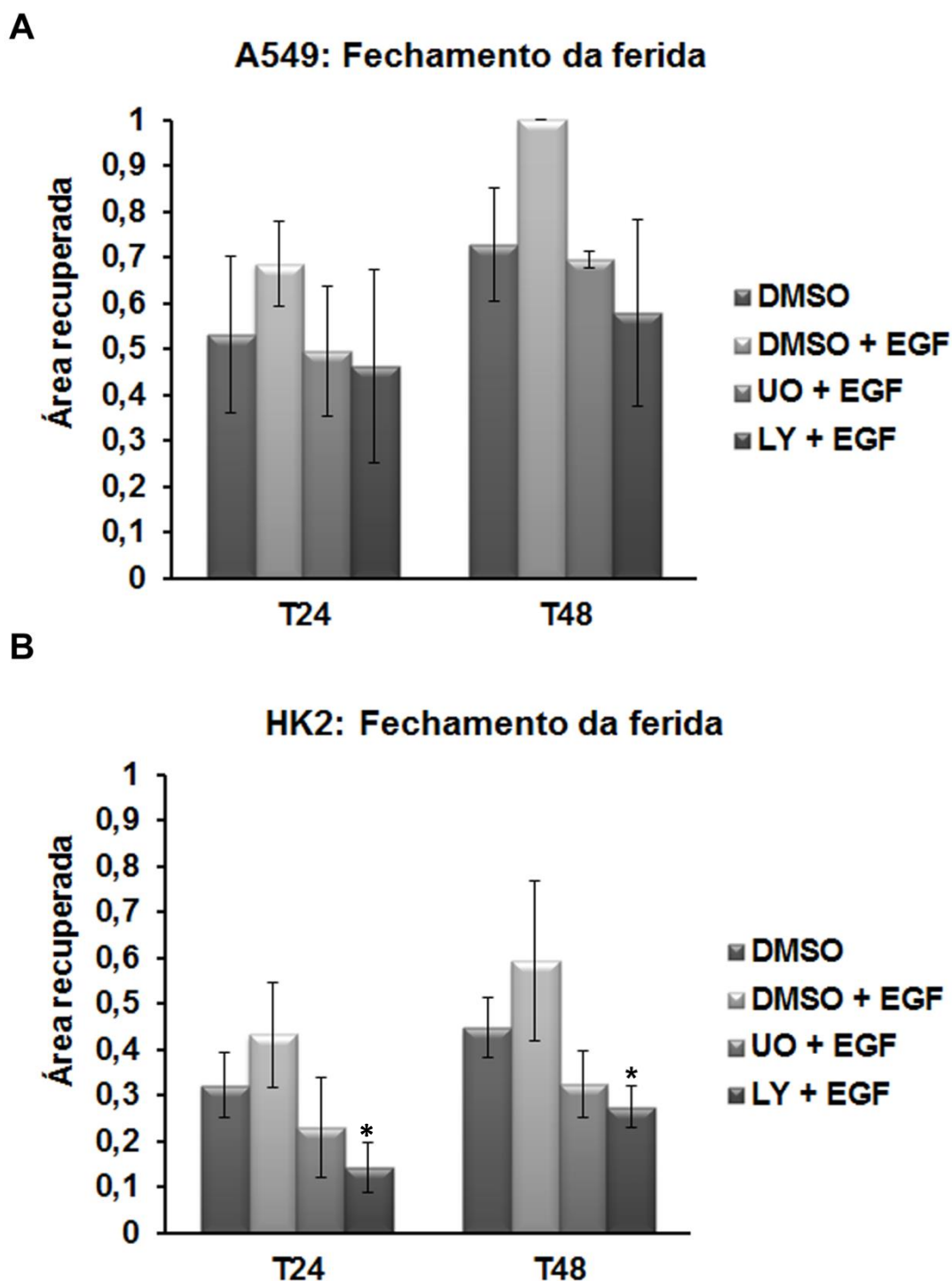


Figura 55 - Gráficos mostrando a frequência de células que recuperaram a área das feridas após 24 e 48 horas de exposição ao EGF e aos inibidores de ERK (U0126) e de Akt (LY294002). **A** - Recuperação das feridas pelas células A549. **B** - Recuperação das feridas pelas células HK2. As células de ambas as linhagens estimuladas pelo EGF migraram e fecharam a ferida mais rápido. U0126 e LY294002 diminuíram o efeito do EGF para a migração das células. As células HK2 tratadas com LY294002 apresentaram uma diminuição significativa da migração celular, quando comparadas com as células estimuladas com EGF (DMSO + EGF). * $P < 0,05$. Barras = desvio padrão.

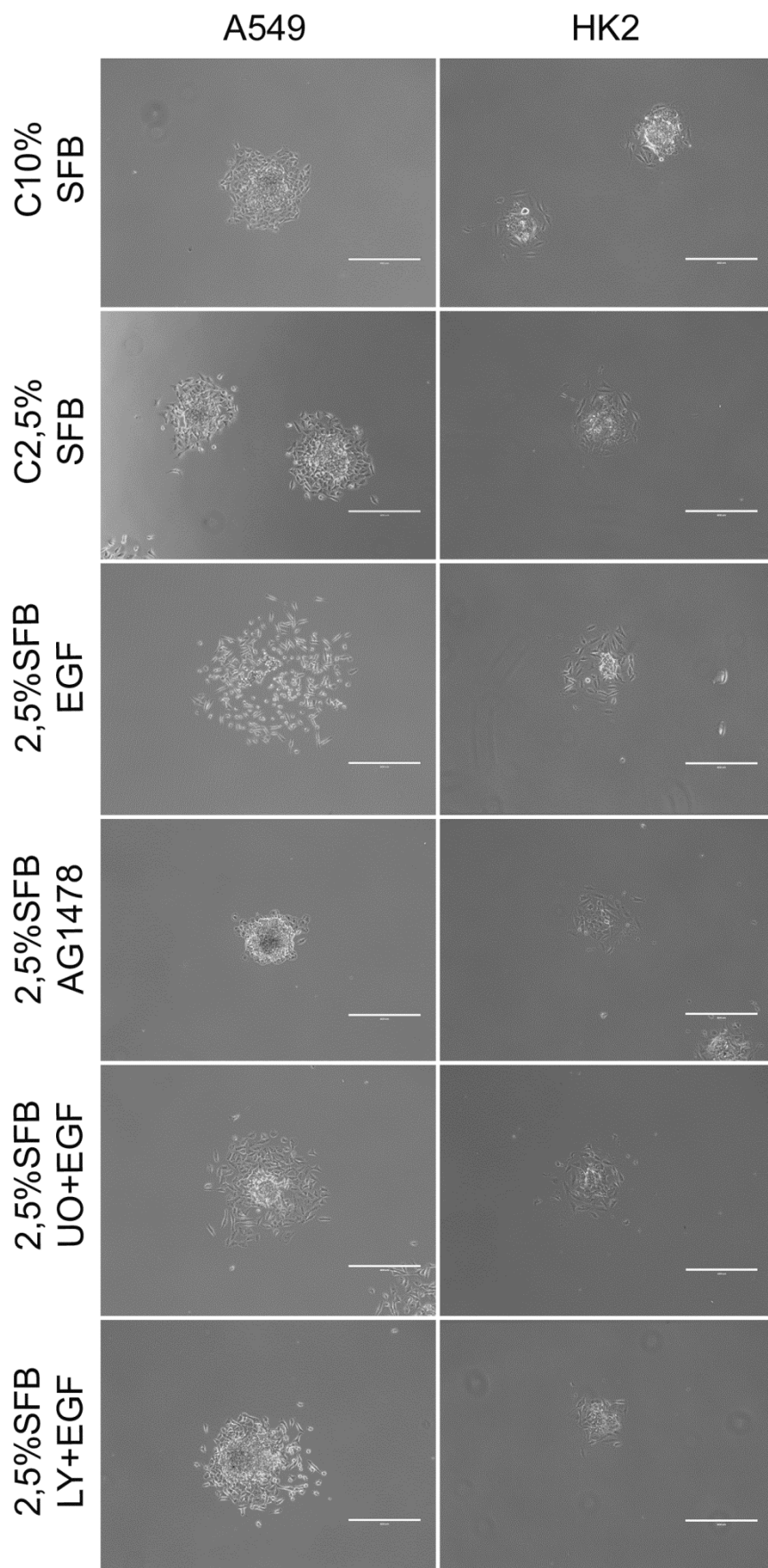


Figura 56 - O método de migração de esferoide foi utilizado para analisar a migração das células dos esferoides formados pelas linhagens A549 e HK2. Os esferoides foram transferidos para placas que permitiam sua adesão e as células começaram a migrar a partir do esferoide. Os grupos tratados por 24 horas foram: C10% SFB, C2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF, 2,5% SFB + AG1478 + EGF, 2,5% SFB + U0126 + EGF ou 2,5% SFB + LY294002 + EGF. Os esferoides das linhagens A549 e HK2 foram tratados com AG1478, U0126 ou LY294002 por 1 hora antes da adição de EGF. As imagens ilustram a migração das células após 24 horas de tratamento. As células da linhagem A549 migraram mais comparadas com as da linhagem HK2. As barras correspondem a 200 μ m.

A distância percorrida pelas células a partir dos esferoides foi mensurada através da medição dos diâmetros formados pelas células ao redor dos esferoides, após 24 horas em cultura com os tratamentos. O maior diâmetro foi escolhido e subtraído do diâmetro inicial do esferoide. Com isso, obteve-se a distância que as células percorreram. O diâmetro de 5 esferoides de cada grupo foi medido e o experimento foi repetido 3 vezes. Os grupos experimentais foram: C10% SFB, C2,5% SFB, 2,5% SFB + EGF, 2,5% SFB + AG1478, 2,5% SFB + U0126 + EGF e 2,5% SFB + LY294002 + EGF. Os gráficos da figura 57 mostram as médias das distâncias percorridas pelas células a partir das bordas dos esferoides.

As células dos esferoides da linhagem A549 estimuladas com EGF foram as que mais migraram (Figura 57 A). As células tratadas com o inibidor AG1478 foram as que migraram menos. As células inibidas por U0126 (U0 + EGF) migraram mais que as células dos grupos controle, porém menos que aquelas estimuladas com EGF. Não houve diferença entre a migração das células inibidas por U0126 e LY294002. As células inibidas por LY204002 (LY + EGF) migraram mais que os grupos controle e menos que as células estimuladas com EGF. Ambos os inibidores reduziram a sinalização para a migração celular conferida pelo estímulo com EGF.

As células dos esferoides da linhagem HK2 estimuladas com EGF migraram mais que as células controle e que as células tratadas com o inibidor AG1478, mas não houve diferença estatística entre o grupo estimulado com EGF e o grupo U0126 + EGF (Figura 57 B). As células inibidas com U0126 só migraram mais que as células do grupo controle 2,5% SFB. As células inibidas com LY294002 migraram menos que as células estimuladas com EGF, apresentando migração igual à dos outros grupos experimentais. A inibição de p-Akt pelo inibidor LY294002 reduziu a sinalização para a migração celular conferida pelo estímulo com EGF.

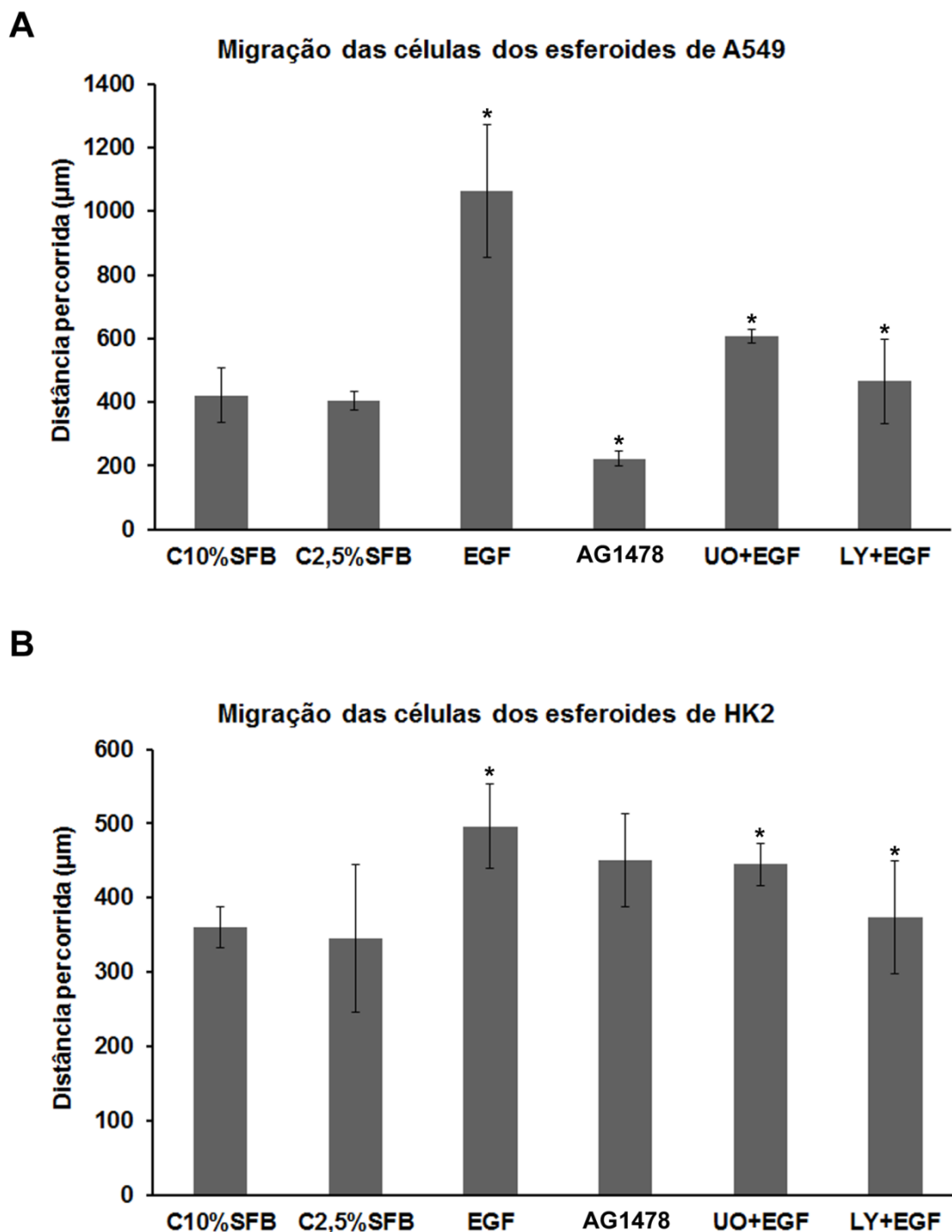


Figura 57 - Os gráficos mostram a distância percorrida pelas células a partir dos esferoides. **A** - Distância percorrida pelas células da linhagem A549. As células estimuladas com EGF migraram mais e as inibidas com AG1478 migraram menos. Os grupos experimentais EGF e AG1478 foram diferentes de todos os outros grupos e diferentes entre si. Os inibidores U0126 e LY294002 reduziram os efeitos do EGF na migração celular. Os grupos experimentais U0126 e LY294002 são diferentes de todos os outros, mas iguais entre si. **B** - Distância percorrida pelas células da linhagem HK2. As células estimuladas com EGF foram as que mais migraram e as inibidas com LY294002 as que menos migraram. A via de sinalização mediada por Akt está envolvida com a migração celular induzida por EGF. O grupo experimental EGF foi diferente de todos os outros grupos, exceto do grupo UO + EGF. O grupo experimental UO + EGF foi diferente do grupo C2,5% SFB. O grupo experimental LY + EGF foi diferente somente do grupo EGF. * $P < 0,05$. Barras = desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EGFR NAS LINHAGENS A549 E HK2 CULTIVADAS EM MONOCAMADA

Neste estudo detectamos 3 cópias do gene ErbB1 na linhagem A549, o que concorda com o descrito previamente por Amann et al. (2005). A linhagem HK2 apresentou heterogeneidade quanto ao número de cópias de ErbB1 por núcleo, provavelmente por existirem subpopulações na cultura. Foi reportado que a linhagem MDA-MB-468 CD44⁺/CD24⁻/^{LOW}, derivada de câncer de mama, também apresenta células com número variável de cópias do gene ErbB1 por núcleo devido à segregação assimétrica dos cromossomos durante a mitose, após a ocorrência de quebra-fusão-ponte (AGELOPOULOS et al., 2010). Experimentos realizados com linfócitos, utilizando compostos que causam danos no DNA, mostraram a possibilidade da presença de sítios frágeis próximos ao gene ErbB1, que podem contribuir para quebras próximas ao gene (TIDOW et al., 2003). As células da linhagem HK2 apresentam frequência de 2,4% de células em mitose multipolar e 3,7% de células micronucleadas, sugerindo que durante a mitose podem ocorrer erros na segregação dos cromossomos e possíveis quebras (CORTEZ et al., 2011). A ocorrência de erros na segregação cromossômica juntamente com a possibilidade de quebras em sítios frágeis próximos ao gene ErbB1 podem explicar as subpopulações de células HK2 com diferente número de cópias do gene ErbB1. Sendo assim, podemos inferir que as células da linhagem HK2 apresentam maior instabilidade genética que as células da linhagem A549.

Neste estudo foi demonstrado que ambas as linhagens têm aumento do número de cópias de ErbB1, embora as células HK2 apresentem maior número de cópias desse gene por núcleo quando comparadas com a linhagem A549. Estudos prévios reportaram um aumento no número de cópias do gene ErbB1 em tumores de células derivadas de carcinoma de pulmão humano (HIRSCH et al., 2005; VARELLA-GARCIA, 2006). Usualmente os níveis de expressão de EGFR são maiores nas células com ampliações e mutações no gene ErbB1 (OKABE et al., 2007). Logo, esperava-se que a expressão de EGFR fosse maior nas células HK2 do que nas células A549, mas o contrário foi encontrado. A redução dos níveis de RNA mensageiro transcrito pelo gene ErbB1 foi acompanhada de uma diminuição da expressão proteica de EGFR na linhagem HK2, quando comparadas com as da linhagem A549. O ErbB1

deve possuir um tipo de regulação provavelmente por metilação, evento comum em alguns genes (p16, DAP, CDH13) em cânceres de pulmão (SEKIDO et al., 2003).

Muitos estudos têm focado na padronização do uso da hibridização fluorescente *in situ* como uma possível técnica para diagnóstico e triagem de pacientes para o tratamento com inibidores de EGFR. Baseando-se nesses estudos, amostras de células de tumores com mais de três cópias do gene ErbB1 e com amplificação gênica podem ser considerados FISH positivas indicando um pior prognóstico da doença (EBERHARD et al., 2008). Entretanto, os resultados obtidos sugerem que a linhagem HK2 poderia ser considerada FISH positiva, apesar da expressão reduzida de EGFR. Dessa forma é possível que existam outros casos em que há aumento na quantidade de cópias do gene ErbB1, porém com baixa expressão do receptor ou até sua ausência. Talvez a análise da quantidade de cópias do gene, juntamente com a expressão proteica, levaria a uma melhor interpretação de cada caso, possivelmente contribuindo para um tratamento mais personalizado. Em suma, o nível de expressão de EGFR não parece estar diretamente relacionado com o número de cópias do gene ErbB1 nas linhagens A549 e HK2.

Além da diferença no número de cópias do gene ErbB1 entre as linhagens A549 e HK2, foram encontradas alterações na localização e nível de expressão de EGFR após estímulo com EGF. A linhagem A549, após estímulo com EGF, apresentava EGFR localizado em estruturas similares a vesículas dispersas no citoplasma e em aglomerados próximos ao núcleo. A localização do EGFR em vesículas concorda com outro estudo realizado com a linhagem A549 em condições similares de cultivo (JARAMILLO et al., 2008). Esse mesmo padrão de marcação também foi observado em outra linhagem derivada de células não pequenas de pulmão humano, a PC-14, quando estimulada com 100 ng/ml de EGF (MAEGAWA et al., 2007). A linhagem HK2 também apresentou o EGFR localizado em estruturas similares a vesículas, porém em menor quantidade.

O EGFR ativado é endocitado por meio de vesículas revestidas por clatrina, e o receptor pode ser reciclado para a membrana celular ou retido nos endossomos com destino à degradação pelos lisossomos. O receptor é reciclado quando o ligante se dissocia dele e a não dissociação faz o complexo se acumular nos corpos multivesiculares, promovendo a degradação pelos lisossomos. A internalização rápida do receptor remove o receptor ativado da membrana celular encaminhando-o para degradação, promovendo uma regulação negativa (*downregulation*) (SORKIN; ZASTROW, 2002). A degradação pelos lisossomos

diminui os níveis de EGFR e a sinalização citoplasmática nas células (BEGUINOT et al., 1984; STOSCHECK; CARPENTER, 1984).

As estruturas similares a vesículas contendo EGFR observadas em ambas as linhagens podem estar relacionadas com a via de degradação do EGFR. O ligante EGF não se dissocia do EGFR nos endossomos (SORKIN; ZASTROW, 2002) e sua adição estimula a internalização constante do receptor (HOFMAN et al., 2010). Desta forma, as vesículas contendo p-EGFR observadas nas duas linhagens devem estar sendo encaminhadas para os lisossomos.

As vesículas contendo a marcação para o EGFR que colocalizaram com a marcação de golgina, nas células A549 estimuladas com EGF, estão envolvidas com a síntese de EGFR e encaminhamento para a membrana. Esses dados sugerem que o receptor EGFR estaria destinado para a membrana celular a fim de repor a degradação da forma fosforilada (p-EGFR). Os aglomerados de EGFR observados próximo ao núcleo das células A549 corresponderiam ao receptor no interior do Complexo de Golgi, antes de ser encaminhado para as vesículas. A via de degradação do receptor provavelmente está ativa, já que quando fosforilado ele é internalizado (vesículas com p-EGFR). Entretanto, os dados obtidos por *western-blotting* mostram manutenção da expressão de EGFR após estímulo com EGF na linhagem A549. O nível de EGFR não diminuiu após estímulo com EGF, pois as células estão produzindo o receptor.

A linhagem HK2 não apresentou vesículas de rota de produção, visto a falta de colocalização da marcação do EGFR com a golgina. O nível de expressão de EGFR após estímulo com EGF é menor do que o observado nas células controle. Assim, a marcação de p-EGFR nas vesículas de células estimuladas com EGF seria decorrente da rota de degradação do EGFR após ativação. Então, o EGFR estaria sendo degradado e não mais sintetizado pelas células HK2.

O mecanismo de *downregulation* pode contribuir para o aumento da eficácia de terapias com inibidores de EGFR por meio da regulação dos efeitos da sinalização desse receptor. Por exemplo, anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpos, que têm como alvo o domínio externo do EGFR, podem promover *downregulation* (FRIEDMAN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010) e a endocitose de EGFR, mediada por EGF, está intimamente relacionada com a sensibilidade ao inibidor do domínio tirosina quinase gefitinib em células não pequenas de pulmão humano (NISHIMURA et al., 2007). Esses relatos sugerem que

células tumorais que degradem o EGFR podem ser mais sensíveis a tratamentos. Baseando-se nesse aspecto, a linhagem HK2 poderia ser considerada menos agressiva.

Outro aspecto observado é que as células HK2 possuem expressão de p-EGFR em células não estimuladas e possivelmente essas células contêm o EGFR fosforilado constitutivamente. Células não pequenas de câncer de pulmão contendo mutações endógenas no gene ErbB1, como por exemplo, no exon 19 ou mutação pontual no exon 21, apresentaram dímeros de EGFR sem a presença do ligante, sugerindo que a ativação constitutiva do receptor mutado é independente da ligação com o ligante para a formação do dímero (OKABE et al., 2007). As mutações podem causar mudanças nos domínios do EGFR desencadeando a formação de dímeros sem a necessidade do ligante para induzir a mudança conformacional das moléculas. A linhagem A549 não possui mutação no gene ErbB1 e não há detecção de p-EGFR sem o estímulo com EGF, como também verificado por Okabe et al. (2007).

5.2 ESTÍMULO COM EGF PROMOVE MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS CULTIVADAS EM MONOCAMADA

A fosforilação de EGFR promovida pelo EGF não afetou a proliferação das células A549 e HK2. Vários estudos relacionam a ativação pelo ligante EGF com a proliferação celular, mas os resultados encontrados são contraditórios. Alguns trabalhos detectaram proliferação de células A549 após estímulo com EGF (BOST et al., 1997; HOU et al., 2011). Entretanto, outro trabalho não verificou proliferação celular nas células A549 após estímulo com EGF e mostrou diminuição na proliferação em células na linhagem A431 (MAEGAWA et al., 2007). Da mesma forma, em alguns experimentos realizados neste trabalho também foi observada a diminuição do número de células após estímulo com EGF, nas linhagens A549 e HK2.

O estímulo com EGF não induziu a proliferação celular e a inibição por AG1478 também não interferiu no número de células das linhagens analisadas. A linhagem A549 estimulada com EGF e HGF, um ligante do receptor c-Met, mostrou um efeito sinérgico na proliferação celular de acordo com Puri e Salgia (2008). Então, é possível que somente a via de sinalização ativada pelo EGFR não seja suficiente para estimular a proliferação das células A549 e HK2 nas condições utilizadas. É possível que a inibição por AG1478 não tenha

alterado o número de células devido ao efeito de outros receptores do tipo tirosina quinase que continuaram a sinalizar, mantendo a taxa basal de proliferação celular. Uma interação entre diferentes tipos de receptores tirosina quinase foi descrita em gliomas: esses receptores estavam co-ativados e mantinham a sinalização citoplasmática. A combinação de diferentes inibidores, tendo como alvos esses receptores, causou a diminuição da sinalização (STOMMEL et al., 2007). A relação entre receptores tirosina quinase é tão íntima que algumas linhagens celulares de câncer de pulmão exibem a inibição de EGFR e c-Met depois do tratamento com gefitinib (GUO et al., 2008). A ativação de vários receptores do tipo tirosina quinase pode potencializar a sinalização celular e a múltipla inibição é mais eficiente para redução da resposta.

Embora não tenham ocorrido alterações na proliferação celular, as células estimuladas com EGF apresentaram alterações morfológicas similares às observadas na TEM (DENLINGER et al., 2010). A indução de transição epitélio mesenquimal (TEM) induzida pelo estímulo com EGF foi descrita anteriormente para as células A549 (JARAMILLO et al., 2008; PETER et al., 2009). Entretanto, no presente estudo não foram detectadas alterações no padrão de expressão de proteínas associadas com a TEM, como diminuição da expressão de citoqueratina e de E-caderina e aumento na expressão de vimentina. Já foi demonstrado que as células das linhagens A549 e HK2 expressam vimentina apesar de sua origem epitelial (MANELLI-OLIVEIRA, 2001). Desta forma, a TEM pode estar ocorrendo nessas células sem que ocorra o aumento da expressão de vimentina, já que essa proteína é expressa normalmente por essas linhagens.

A expressão de E-caderina, outro marcador da TEM, não foi detectada nas células HK2. As células A549 expressam E-caderina, mas os níveis de expressão dessa proteína não diminuíram após estímulo com EGF, como esperado para confirmar a TEM. Entretanto, o estímulo com EGF induziu a TEM em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço sem alterações nos níveis de expressão de E-caderina (HOLZ et al., 2011). Em relação à investigação do RNAm, somente as células A549 mostraram um discreto aumento nos níveis de RNAm para N-caderina em células estimuladas com EGF. As células A549 e HK2 podem ter realizado a TEM induzida pelo EGF, mas não foi possível confirmá-la com os marcadores utilizados.

As células inibidas com AG1478 não apresentaram mudanças na morfologia, mantendo as características de células epiteliais. Isso mostra que a ativação de EGFR

realmente estava relacionada com a mudança da morfologia observada nessas linhagens. Os dados apresentados concordam com o estudo de Jaramillo et al. (2008) em que a linhagem A549, sob estímulo de EGF, foi capaz de adquirir características de células mesenquimais, como maior motilidade, e o tratamento com AG1478 inibiu essa capacidade migratória.

As células que realizam a TEM não são particularmente agressivas no momento em que estão realizando a transição para o estado mesenquimal, pois exibem parada do ciclo celular (DENLINGER et al., 2010). Os fatores de transcrição associados a TEM regulam negativamente a transcrição de numerosos fatores envolvidos com a proliferação celular (PETER et al., 2009). O aumento da população de células na fase G1, observado nas células HK2 estimuladas com EGF, pode sugerir uma parada no ciclo celular. Então o estímulo com EGF não promoveu aumento na proliferação das células A549 e HK2 e isto pode ser devido a essa parada do ciclo celular, sendo talvez um indicativo de TEM. Entretanto, os dados em conjunto não suportam a evidência da TEM induzida por EGF.

Apesar da ausência de evidências concretas da TEM induzida pelo EGF, as células A549 e HK2 apresentaram um aumento na distância e velocidade de migração celular após ativação de EGFR. O ensaio de ferida e os experimentos com microscopia em tempo real demonstraram que as células A549 apresentam maior mobilidade quando comparadas com as células HK2 e que ambas as células migraram mais sob ação do EGF. Os resultados apresentados não são suficientes para confirmar a TEM mediada pelo EGF, mas demonstraram que o EGF estimula a migração das células A549 e HK2 cultivadas em monocamada.

Caino et al. (2012) mostraram que a ativação de EGFR por EGF, também na linhagem A549, resultou na ativação de Rac1 mediada por PKC, proteína ativada pela sinalização citoplasmática de EGFR (PLC/DAG/PKC). Rac 1, membro da família Rho de pequenas GTPases, é crucial na reorganização do citoesqueleto de actina e mobilidade celular (CAINO et al., 2012). Talvez essa seja a via envolvida com as alterações dos microfilamentos de actina observadas nas linhagens A549 e HK2, sob ação do EGF.

Há trabalhos que também descreveram o envolvimento da ativação do EGFR pelo EGF com o aumento da migração celular na linhagem A549 (GAO et al., 2011; JARAMILLO et al., 2008; PREET et al., 2008). Também há trabalhos mostrando a migração mediada por EGF/EGFR em outras linhagens celulares. Um exemplo foi o trabalho desenvolvido por Hartman et al. (2013) em que o estímulo com EGF promoveu a migração celular de linhagens

tumorais derivadas de câncer de mama. A inibição de SHP2, um efetor da sinalização do EGFR, causou a diminuição dessa migração. As células estimuladas com EGF formaram lamelipódios maiores e persistentes enquanto que as células contendo o SHP2 silenciado produziram lamelipódios menores e protrusões de curta duração. Experimentos realizados para verificar a persistência dos lamelipódios sugeriram que o SHP2, mediado pelo estímulo com EGF, promoveu o movimento celular por aumentar a persistência dos lamelipódios. Mais especificamente, SHP2 modula a atividade de FAK (quinase de adesão focal), contribuindo para a migração induzida pelo EGF (HARTMAN et al., 2013).

Outro trabalho mostrou que o estímulo com EGF em células de câncer de colo do útero ME180 induziu a expressão de oncoproteína FTS (*Fused Toes Homolog*), promoveu alteração da morfologia das células de cuboides para células fusiformes, induziu TEM, causou aumento da migração celular e aumentou a produção de MMP-2 e MMP-9. A regulação de FTS por EGF foi mediada pela via EGF/EGFR/ERK/AFT-2 promovendo o aumento de FTS, que promoveu a indução da TEM (MUTHUSAMI et al., 2014). As células imortalizadas da linhagem AME-1, derivada de ameloblastoma (tumor odontogênico), quando estimuladas com EGF, migraram mais e também expressaram MMP-2 e MMP-9. A inibição de EGFR com RNA de interferência diminuiu a expressão das MMPs (ROSA, et al., 2014). Linhagens celulares de câncer de próstata, DU145 e PC3, também realizaram TEM e migraram mais após estímulo com EGF (GAN et al., 2010).

O interessante é verificar que a ativação do EGFR pelo EGF está relacionada direta ou indiretamente com os microfilamentos de actina (ativação de Rac 1, formação de lamelipódios e adesão focal) como também foi verificado neste trabalho pela drástica alteração do citoesqueleto de actina nas células A549 e HK2 sob efeito de EGF.

5.3 A CULTURA 3D DAS LINHAGENS A549 E HK2

A segunda etapa do trabalho investigou os efeitos do EGF nos esferoides formados pelas células A549 e HK2, visto que a cultura 3D se aproxima mais às características celulares encontradas *in vivo*. Também foi levado em conta para a realização dos experimentos com a cultura tridimensional o fato de estudos mostrarem que o estímulo com EGF promoveu a proliferação celular em células cultivadas em modelos tridimensionais, fato interessante já que não foi detectada a proliferação celular induzida por EGF nas células cultivadas em monocamada.

Esferoides formados pelas células A431, carcinoma de células escamosas humanas, tiveram a proliferação aumentada após estímulo com EGF enquanto a mesma concentração desse ligante inibiu a proliferação celular das células cultivadas em monocamada (MANSBRIDGE et al., 1992). O trabalho publicado por Jaramillo et al. (2008) também mostrou que células A549 cultivadas em monocamada e estimuladas com EGF por 48 horas, apresentaram um “modesto” aumento na proliferação celular. Entretanto, quando essas células foram cultivadas em ágar semi-sólido e estimuladas com EGF houve aumento de 50% na proliferação. Lee et al. (2011) cultivaram células epiteliais broncoatraqueais humanas em cultura 3D de cultura, utilizando o método de cultura tridimensional organotípico, com interface ar-líquido. Foi verificada a proliferação celular induzida pelo EGF, que causou aumento da expressão de ciclina D1 mediada por MAP/ERK quinase. Essa proliferação foi inibida pelo tratamento com erlotinib, inibidor do domínio tirosina quinase de EGFR. Os autores concluíram que a hiperplasia de células do brônquio pode ser modelada *in vitro* usando células cultivadas em um modelo 3D. A linhagem H1975, adenocarcinoma de pulmão, formou esferoides e o estímulo com EGF promoveu o aumento da proliferação celular (EKERT et al., 2014). Então, as culturas 3D de células A549 e HK2 foram padronizadas a fim de verificar se o EGF poderia atuar na proliferação celular quando essas células fossem cultivadas em cultura tridimensional.

A técnica para cultura 3D de células derivadas de câncer de mama foi estabelecida e amplamente utilizada pelo grupo do laboratório, tanto com a adição de elementos exógenos de matriz extracelular (FREITAS et al., 2008) como na cultura de células em suspensão para formação de esferoides (AMARAL et al., 2011). O cultivo das células derivadas de câncer de pulmão foi realizado baseando-se na técnica já desenvolvida no laboratório

(AMARAL et al., 2011), feito em placas de Petri plásticas não aderentes, com inóculo inicial de 4×10^5 células por placa, em estufa a 37 °C sem a necessidade de rotação. Entretanto, as células A549 e HK2 não se comportaram como as células derivadas de câncer de mama e acabaram aderindo às placas.

Existem vários métodos descritos para o desenvolvimento de cultura 3D e um deles é cultivar as células em frascos submetidos à rotação (PAGE et al., 2013). Então as células foram inoculadas nas placas e foram colocadas sob agitação de 10 rpm. Entretanto essa agitação permitiu que os agregados multicelulares aderissem às placas. A rotação foi aumentada para 20 rpm e os esferoides foram encaminhados para o centro da placa, aderindo uns aos outros. Para diminuir a concentração dos esferoides na região central da placa, o agitador foi ajustado para dar 1 volta no sentido horário e outra no anti-horário. A técnica para a formação dos esferoides sob agitação de 20 rpm com agitação alternada mostrou-se eficiente, propiciou a produção de grande quantidade de esferoides e foi repetitiva. Não existem relatos na literatura que utilizem esse método para produção de esferoides a partir de células não pequenas de câncer de pulmão.

Já foram descritos outros métodos de cultivo 3D com a linhagem A549 e as culturas são realizadas de diversas formas utilizando: colágeno (LI et al., 2013; NIRMALANANDHAN et al., 2010), poly-HEMA e membrana basal reconstituída (IVASCU; KUBBIES, 2006; YANG et al., 2009), matrigel (LI et al., 2012), modelo de pulmão 3D *ex vivo* (MISHRA et al., 2012), matriz de um tecido (arcabouço) no qual as células foram retiradas (STRATMANN et al., 2014), método de cultura 3D organotípico de interface ar-líquido (LEE et al., 2011) e a cultura 3D com membrana basal em câmara microfluida com suplemento contínuo de meio fresco (WANG et al., 2013).

Um recente estudo elaborou um método para cultivar células não pequenas de câncer de pulmão utilizando a linhagem A549 em cultura 3D para formação de esferoides (EKERT et al., 2014). As células foram cultivadas por 4 dias em placas de 96 poços contendo fundo redondo, com tratamento para baixa adesão celular, com a formação de um esferoide em cada poço. Entretanto, após 4 dias em cultura a viabilidade das células nos esferoides diminuiu (EKERT et al., 2014). Embora a metodologia citada acima para o cultivo 3D seja similar à utilizada neste trabalho, ou seja, cultivo em substrato não aderente, o método aqui desenvolvido e descrito nos resultados utiliza placas de Petri sob rotação alternada e os esferoides puderam permanecer em cultura por 14 dias, sem indícios de diminuição da

viabilidade celular e com a presença de células em divisão celular. O método foi eficaz, reprodutível e com grande produção de esferoides em cultura. Outro aspecto a ser citado é que não existem estudos com a linhagem HK2 cultivada em cultura 3D, sendo muito relevante a padronização dessa técnica para essa linhagem.

O período de cultura de 14 dias foi escolhido baseado nos trabalhos realizados com a linhagem A549 descritos na literatura. Alguns trabalhos cultivaram essa linhagem em um modelo 3D por períodos curtos de tempo, como 24 horas (IVASCU; KUBBIES, 2006; LI et al., 2013), 48 horas (YANG et al., 2009) e 4 a 5 dias (NIRMALANANDHAN et al., 2010); enquanto outros cultivaram por períodos maiores de 10 a 15 dias (LEE et al., 2011; LI et al., 2012; MISHRA et al., 2012; STRATMANN et al., 2014). No modelo de cultura 3D utilizado no presente trabalho, as células da linhagem A549 formam esferoides compactos e arredondados depois do 7º dia de cultura e devido a isso os esferoides foram cultivados por períodos maiores. Outro aspecto relevante é que a ampliação do período de cultivo possibilita às células adquirirem propriedades mais próximas das encontradas *in vivo*, podendo até serem observadas heterogeneidade e diferenciação celular (AMARAL et al., 2010, 2011; FRIEDRICH et al., 2007; HALL et al., 1982; WILLIAM et al., 1992).

5.4 CARACTERIZAÇÃO NOS ESFEROIDES DAS LINHAGENS A549 E HK2: MORFOLOGIA E EXPRESSÃO PROTEICA

A cultura 3D foi monitorada por microscopia de luz durante os 14 dias de cultura. Analisamos a morfologia dos esferoides de acordo com Kenny et al. (2007). As células da linhagem A549 até o 7º dia de cultura formaram agregados multicelulares, podendo os esferoides serem classificados morfologicamente nesse período como *Grape-like* (cachos de uva). Entretanto, após o 7º dia de cultivo eles se tornam mais compactos e adquirem um formato mais característico de esferoides, podendo ser classificados como *Mass* (massa de células). Esferoides derivados de linhagens celulares de tumores neuroendócrinos também formaram, primeiramente, agregados celulares (massas multicelulares) e a partir do 4º dia foi possível observar esferoides com formato arredondado (WONG et al., 2012). Já as células da linhagem HK2 se organizaram formando esferoides arredondados e compactos durante todo o período de cultivo, podendo ser classificados como *Mass*.

Ivascu e Kubbies (2006) mostraram que células da linhagem A549 centrifugadas e então cultivadas por 24 horas em placa contendo poly-HEMA formavam agregados celulares. A adição de membrana basal reconstituída, antes da centrifugação, tornou possível a obtenção de esferoides compactos. O método desenvolvido para cultivo dos esferoides, apresentado no presente trabalho, não utiliza nenhum componente exógeno no meio de cultura, evitando interferências externas na cultura. Em 24 horas de cultura, as células da linhagem A549 formaram agregados celulares, mas aumentando o tempo de cultivo obtivemos esferoides com formato compacto sem a adição de componentes da membrana basal.

A caracterização morfológica dos esferoides foi realizada por meio de coloração dos microfilamentos de actina e do DNA, para identificar mitoses e fragmentações nucleares características de apoptose. Apoptoses foram encontradas no centro e na periferia dos esferoides da linhagem A549 e os esferoides da linhagem HK2, além das apoptoses, apresentaram mitoses no centro e na periferia. Este padrão não concorda com o observado na literatura, que descreve a localização de mitoses na periferia dos esferoides e de apoptoses no centro (AMARAL et al., 2010; FRIEDRICH et al., 2007; SANTINI; RAINALDI, 1999).

Outro método utilizado para a caracterização dos esferoides foi a coloração com hematoxilina e eosina que mostrou uma concentração de figuras apoptóticas no centro dos esferoides da linhagem A549, podendo demonstrar o início da formação de um lúmen. A formação de lúmen em esferoides já foi descrita anteriormente, como por exemplo, em esferoides formados por células derivada de câncer de mama (AMARAL et al., 2010), de carcinoma de pâncreas (LONGATI et al., 2013) e de câncer do endométrio (CHITCHOLTAN et al., 2013).

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou aspectos interessantes em relação à interação entre as células dos esferoides. As células da linhagem A549 apresentaram a morfologia esperada para a formação dos esferoides: as células mantinham contato com as membranas das células adjacentes com a presença de junções aderentes e desmossomos. Esferoides formados a partir de células tumorais de pâncreas e de mama apresentaram a organização de suas células, por microscopia eletrônica, similar à encontrada nos esferoides formados por células da linhagem A549 (AMARAL et al., 2010; LONGATI et al., 2013). A expressão de E-caderina, proteína relacionada à adesão celular, aumentou nos esferoides

formados a partir das células A549 em relação à cultura 2D. O aumento da expressão de E-caderina em células cultivadas em modelos 3D é esperado e já foi descrito para outras linhagens celulares (AMARAL et al., 2011; LONGATI et al., 2013; XIANG et al., 2011), já que as interações célula-célula podem ser formadas por todo o limite celular nos esferoides (BOKHARI et al., 2007; CUKIERMAN et al., 2001).

Entretanto, as células da linhagem HK2, cultivadas em modelo 3D, apresentaram características morfológicas diferentes daquelas observadas na linhagem A549. Foi difícil identificar os limites das membranas das células, que não estavam justapostas e apresentavam muitas dobras e protruções. Essas células formaram esferoides, mas não foi possível observar junções aderentes e desmossomos entre as células. Isso deve ter sido devido à ausência da expressão de E-caderina nos esferoides formados pela linhagem HK2. Os níveis de RNAm para E-caderina também diminuíram nos esferoides comparando-se com o 2D. Este resultado é interessante, pois a linhagem HK2 forma esferoides compactos e arredondados desde o início do período de cultivo da cultura 3D e apresenta células com redução em componentes importantes para a adesão célula a célula. Entretanto, detectou-se uma possível deposição de matriz extracelular entre as células HK2: talvez os múltiplos dobramentos de membrana observados estejam associados com a produção dessas substâncias e as membranas interajam com essa matriz. As protruções da membrana podem contribuir para um mecanismo diferente de adesão célula a célula.

Kenny et al. (2007) verificaram que linhagens derivadas de câncer de mama, cultivadas em um modelo 3D, apresentaram diferentes padrões de expressão de E-caderina associados à morfologia do esferoide. Esferoides apresentando a morfologia “estrelada” (*stellate*) não apresentaram a expressão de E-caderina e os com forma de “cacho de uva” (*grape-like*) geralmente apresentaram baixos níveis de expressão dessa proteína, refletindo a menor interação célula-célula nesses tipos de esferoide. No entanto, todos os esferoides com a forma de massa (*mass*) apresentaram alta expressão de E-caderina. Esferoides da linhagem HK2 possuem a forma de massa, mas não apresentaram a expressão de E-caderina, bem como o que foi descrito para os esferoides estrelados. Outro trabalho mostrou que células derivadas de câncer de mama não apresentam diferença na expressão de E-caderina, comparando-se as culturas 2D com as 3D (MOISEEVA et al., 2006), mostrando que não é imprescindível aumentar a expressão E-caderina para a formação dos esferoides. Existem outras moléculas de adesão célula-célula além da E-caderina, como CD44, ICAM-1

and LFA-3, e os níveis de expressão dessas proteínas podem variar entre as culturas 2D e 3D (SANTINI; RAINALDI, 1999). Possivelmente, os esferoides formados pela linhagem HK2 expressem outras moléculas relacionadas à adesão celular.

Após a padronização da cultura 3D e de sua caracterização, foi feita a curva de crescimento dos esferoides para a escolha do melhor período para a realização dos tratamentos com EGF e AG1478. A curva de crescimento mostrou que não há alteração no número total de células dos esferoides de ambas as linhagens durante o período de 14 dias. Isso não significa que não houve proliferação celular, já que mitoses foram detectadas nos esferoides de ambas as células. Esferoides possuem grande heterogeneidade celular, com células se dividindo e outras em processo de morte (FRIEDRICH et al., 2007).

A análise do ciclo celular das células presentes nos esferoides apresentou um padrão diferente daquele encontrado nas células cultivadas em monocamada. A maioria das células da cultura tridimensional estava na fase G1 do ciclo celular, em uma proporção maior que a quantidade de células em G1 nas culturas em monocamada. Esses dados apontam para um padrão de proliferação menor nas células cultivadas em cultura 3D quando comparado com as populações celulares da monocamada.

Há vários trabalhos na literatura que mostram que células na cultura 3D proliferam menos que na 2D. Ivascu e Kubbies (2006) também verificaram aumento da frequência de células em fase G1 e diminuição da proliferação celular nos esferoides formados a partir de células de câncer de mama, comparando com dados obtidos com a monocamada. Mishra et al. (2012) cultivaram a linhagem A549 em um modelo 3D *ex vivo* e detectaram menor proliferação celular. Chitcholtan et al. (2013) analisaram o crescimento das culturas 2D e 3D de linhagens celulares de câncer endometrial e verificaram que as células cultivadas em um modelo 3D proliferaram menos. Longati et al. (2013) também mostraram que células de adenocarcinoma pancreático cresceram mais quando cultivadas em um modelo 2D quando comparadas às células cultivadas em 3D.

As áreas dos esferoides foram mensuradas em 7 e 14 dias de cultivo e as medidas apresentaram heterogeneidade para ambas as linhagens. Os esferoides obtidos a partir da cultura de células em suspensão e submetidos à rotação são decorrentes da agregação ao acaso das células e devido a isso é esperado encontrar esferoides com diferentes tamanhos e formas na cultura (PAGE et al., 2013). É possível observar essa variedade no tamanho dos esferoides nas imagens presentes em vários trabalhos que utilizam essa técnica de cultura

3D (AMARAL et al., 2010; SANTINI et al., 1999, 2000). A área dos esferoides, após 14 dias de cultivo, foi maior comparando-se com a área encontrada após 7 dias de cultivo. E, após 14 dias, o número de esferoides com menor área diminuiu na cultura. Isso pode ser uma evidência da agregação de pequenos esferoides formando esferoides maiores, já que o número de células se manteve constante durante os 14 dias de cultivo, como mostra a curva de crescimento. O aumento na área dos esferoides deve ter sido decorrente mais da adesão entre eles do que devido à proliferação das células que os formam.

A expressão proteica de EGFR também foi investigada na cultura 3D, visto que esse receptor vem sendo bastante estudado em câncer de pulmão e tem sido associado com a agressividade da doença, pior prognóstico, baixo índice de sobrevivência, baixa resposta a quimioterapia e resistência a agentes citotóxicos em alguns tumores (BRABENDER et al., 2001). A expressão de EGFR, nas linhagens A549 e HK2, praticamente foi a mesma nas culturas 2D e 3D. Em relação à ativação do EGFR, verificou-se o aumento da fosforilação do receptor por meio da detecção de p-EGFR no modelo 3D em ambas as linhagens comparando-se com os resultados encontrados nas culturas 2D. O aumento de fosforilação de EGFR nos esferoides ocorreu sem a adição de ligantes do receptor no meio de cultura, sugerindo que a cultura 3D pode afetar o comportamento das células em relação ao sistema de ativação do EGFR.

Há controvérsias na literatura sobre a expressão de EGFR em culturas 3D. Chitcholtan et al. (2013) detectaram a mesma expressão de EGFR e p-EGFR em células de câncer de endométrio cultivadas em monocamada e em esferoides e a ativação do EGFR por EGF não influenciou na proliferação das células dos esferoides. Esferoides formados por células de câncer colo retal apresentaram menor expressão de EGFR quando comparada com a expressão encontrada na monocamada (LUCA et al., 2013). Ekert et al. (2014) detectaram, por citometria de fluxo, um decréscimo na densidade do receptor EGFR em esferoides formados pela linhagem A549, comparando-se com a cultura em monocamada. Entretanto os mesmos pesquisadores verificaram o aumento de p-EGFR nos esferoides sem estímulo com ligantes, como também descrito no presente trabalho.

Foi detectada a expressão de EGFR na cultura 2D de ambas as células e verificou-se a presença de 2 bandas para o EGFR, uma de 170 kDa e outra de aproximadamente 140 kDa. A expressão de EGFR foi detectada também nos esferoides de ambas as linhagens, mas somente com a presença da banda de 170 kDa. Moiseeva et al. (2006) também verificaram a

presença dessas duas formas de EGFR no modelo 2D e da presença somente da banda de 170 kDa nos esferoides utilizando células de câncer de mama. Não houve diferença na expressão de EGFR entre as culturas 2D e 3D. Os autores discutem que essa banda de 140 kDa seria correspondente ao EGFRVIII, isoforma do EGFR que se apresenta constitutivamente ativa.

Os níveis de RNAm para EGFR nos esferoides da linhagem A549 foram similares nas culturas 2D e 3D. A linhagem HK2 apresentou um decréscimo nos níveis de RNAm para EGFR nos esferoides quando comparados com a cultura 2D. Luca et al. (2013) mostraram a regulação de genes envolvidos com proliferação, comparando a cultura 2D com a 3D, mostrando genes que podem ter a expressão de RNAm diminuída (EGFR, CMYC e MINA) ou aumentada (BCL6 e JUND).

5.5 ESTÍMULO COM EGF PROMOVE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DOS ESFEROIDES POR MEIO DA SINALIZAÇÃO DE ERK E AKT

O estímulo com EGF não induziu nenhuma alteração na proliferação celular dos esferoides estudados, mesmo com a ativação de p-ERK detectada nos esferoides da linhagem HK2. Entretanto, o EGF causou alterações morfológicas nos esferoides da linhagem A549, como ocorrido com a cultura 2D. A análise de expressão de E-caderina não mostrou indícios de transição epitélio mesenquimal das células dos esferoides.

Um recente trabalho utilizou as células A549 para obtenção de uma cultura 3D. Nele, as células foram encapsuladas com extrato de membrana basal e colocadas na câmara de cultura celular constantemente suplementada com meio fresco. A cultura 3D foi estimulada com EGF e houve formação de invadopódios e essas protruções da membrana diminuíram em número quando utilizado um inibidor de metaloproteinase de matriz. Esse trabalho demonstrou que tal método de cultura 3D foi eficiente para elucidar mecanismos de invasão (WANG et al., 2013). Li et al. (2013) selecionaram células com menor poder de invasão a partir da linhagem A549. Essas células foram então submetidas à radiação ionizante e as que sobreviveram foram cultivadas. As células previamente irradiadas possuíam prolongamentos celulares, tanto na cultura 2D quanto nos esferoides, adquirindo maior poder de invasão. A proteína EGFR e sua forma fosforilada (p-EGFR) estavam mais expressas nas células

previamente irradiadas. Tratamentos com inibidor de EGFR causaram diminuição dos prolongamentos encontrados nas células cultivadas em monocamada e nos esferoides.

Esses dois trabalhos supracitados relacionam o estímulo de EGF com a migração e invasão em esferoides, mas não identificam qual via de sinalização citoplasmática estaria envolvida. Uma vez que o estímulo com EGF também não induziu a proliferação celular nos esferoides formados pelas linhagens A549 e HK2, mas causou a alteração da morfologia dos esferoides formados pela linhagem A549, experimentos foram desenvolvidos para investigar um possível efeito do EGF na migração celular na cultura 3D, como visto na cultura 2D. Entretanto, foram utilizados inibidores da via de ERK e Akt para também elucidar qual via estaria ligada com a possível migração induzida pelo EGF, tanto em experimentos com a cultura 3D como em monocamada.

Os resultados obtidos mostraram que o EGF induziu a migração das células dos esferoides formados por ambas as linhagens e a inibição com AG1478 promoveu a diminuição da migração das células dos esferoides na linhagem A549. Os dados não concordaram com aqueles publicados por Ekert et al. (2014) que adicionaram inibidores do EGFR à cultura de esferoides formados pela linhagem A549 e não observaram redução na migração e viabilidade celular.

Em relação à sinalização citoplasmática desencadeada pela ativação do EGFR, os experimentos com a monocamada apontaram para o envolvimento da via de Akt, na linhagem HK2, e os dados obtidos com a cultura 3D mostram o envolvimento de ERK na linhagem A549 e de Akt em ambas as linhagens. Não há artigos publicados que relacionem a migração induzida pelo EGF em esferoides com a via de sinalização citoplasmática (Akt/ERK). Abaixo estão citados alguns trabalhos que relacionam as vias de ERK e Akt com a migração celular realizados com células cultivadas em monocamada.

Um trabalho realizado com a linhagem A549 relacionou a ativação do EGFR com o aumento da expressão da MMP-9 (matrix metaproteinase-9), evento importante na metástase por promover a degradação da matriz extracelular. Essa ativação foi mediada por Akt e promoveu o aumento da migração das células A549 (CHENG et al., 2010). O tratamento de células A549 com bisphenol A promoveu a fosforilação de ERK, mediada por EGFR/GPER e aumento na produção de MMP-2 e MMP-9, induzindo o aumento da migração celular (ZHANG et al., 2014). O estímulo com EGF promoveu a migração de células epiteliais da lente do olho (HLECs), também pela ativação das vias ERK e Akt, e ativação de MMP-2

(JIANG et al., 2006). Outro trabalho mostrou a relação de ERK e Akt com a migração celular em câncer de mama: a fosforilação de ERK e de Akt promoveu a ativação de AP-1 e NF- κ B e a translocação dessas moléculas para o núcleo, promovendo a expressão de MMP-9, com consequente aumento na migração e invasão. Entretanto, AP-1 e NF- κ B também podem promover a proliferação celular, por meio da transcrição do gene que codifica Ciclina-D1 (SAFDARI et al., 2014).

Um estudo realizado com o Naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione, um componente bioativo de *Avicennia marina*, em células derivadas de câncer de mama MDA-MB-231, mostrou que esse composto foi capaz de inibir a invasão e a migração das células, mediada pelo EGF, por meio da sinalização PI3K/Akt, reduzindo a expressão de MMP-9 (HSIEH et al., 2013). Platycodin D, composto natural extraído de *Platycodon grandiflorum*, inibiu a migração de MDA-MB-231 pela diminuição de MMP-9, inibição da ativação por EGF de EGFR e das vias de ERK e PI3K/Akt (CHUN; KIM, 2013).

A relação de ERK e Akt com a migração celular não é citada só para células tumorais. A invasão adequada do trofoblasto é um passo essencial para a formação da placenta e é importante para o desenvolvimento do feto. A sinalização de PI3K (Akt) e MAPK (ERK), mediada pelo estímulo com EGF, estão envolvidas com a migração do trofoblasto. Essas duas vias são independentes e provavelmente possuem alvos distintos para mediar a invasão dos trofoblastos. Esse trabalho sugeriu que ERK poderia estar envolvido com a regulação de actina/miosina e Akt envolvida na regulação da reorganização do citoesqueleto de actina (QIU et al., 2004). A ativação de ERK pode regular as protrusões de membrana pela fosforilação da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) e promover a desmontagem das adesões focais, promovendo a migração celular (HUANG et al., 2004). A ativação de Akt pode promover a fosforilação de Girdin, um substrato de Akt que tem papel crucial na formação das fibras de stress e dos lamelipódios. Girdin é essencial para a integridade do citoesqueleto de actina e para a migração celular, fornecendo assim uma ligação direta entre a Akt e a migração celular (ENOMOTO et al., 2005).

Sendo assim, muitos trabalhos relacionam as vias de Akt e ERK com o processo de migração celular induzido por EGF em células cultivadas em monocamada, mas há controvérsias sobre qual via estaria realmente envolvida com a sinalização para a migração celular. Alguns trabalhos apontam para a sinalização mediada somente por Akt, somente por ERK ou ainda pela sinalização em conjunto de Akt e ERK. Os resultados apresentados por

este trabalho também mostram o envolvimento de Akt com a migração celular das células HK2, quando cultivadas em monocamada e nos esferoides. Entretanto a linhagem A549, cultivada em monocamada, não apresentou envolvimento de ERK e Akt na migração celular, mas quando essas células foram cultivadas em cultura 3D, encontrou-se o envolvimento das duas vias, Akt e ERK. A linhagem A549 apresentou sinalização diferente para a migração celular nas diferentes formas de cultivo. Provavelmente as duas vias estão envolvidas com a migração mediada pelo EGF, sendo que a via de ERK estaria envolvida com fosforilação da miosina enquanto a sinalização de Akt com a reorganização dos filamentos de actina, fato evidenciado pelas alterações detectadas nos microfilamentos de actina após estímulo com EGF.

6 CONCLUSÃO

O estudo da ativação do EGFR nas linhagens A549 e HK2, cultivadas em monocamada e nos esferoides, resultou em dados importantes para a elucidação da ação desse receptor na progressão do câncer de pulmão, principalmente no seu envolvimento com a migração celular. Com a análise de todos os dados em conjunto podemos concluir:

- ❖ O número de cópias do gene ErbB1 não está associado a maior expressão de EGFR;
- ❖ A ativação do EGFR por EGF e sua inibição por AG1478 não induziu a proliferação celular nos modelos estudados;
- ❖ O estímulo com EGF promoveu alterações na organização dos microfilamentos de actina e aumentou a migração das células. Os dados obtidos não suportam a ideia do envolvimento da ativação da transição epitélio mesenquimal como causa da migração das células estudadas;
- ❖ Conseguimos estabelecer, com sucesso, uma técnica de cultura 3D de células derivadas de carcinoma de pulmão humano sem a utilização de elementos exógenos de matriz extracelular;
- ❖ Concordando com as observações de culturas em monocamada, o estímulo com EGF não induziu a proliferação das células dos esferoides e promoveu a migração celular;
- ❖ O estímulo com EGF promoveu a migração das células da linhagem HK2, cultivadas em monocamada e nos esferoides, dependente da ativação da via Akt;
- ❖ O estímulo com EGF promoveu a migração das células da linhagem A549, cultivadas em monocamada, independentemente da ativação das vias de Akt e ERK. As células dos esferoides de A549, estimuladas com EGF, migraram com dependência da ativação das vias de Akt e ERK.

REFERÊNCIAS*

AGELOPOULOS, K.; BURKHARD G.; HARTMUT S.; HEIKE P.; STEFAN K.; KAI B.; ANTJE A.; MAREK W.; EBERHARD; HORST B.; BURKHARD B. Selective regain of egfr gene copies in model MDA-MB-468. **BMC Cancer**, v.10, n.78, p. 1–10, 2010.

AMANN, J.; KALYANKRISHNA, S.; MASSION, P. P.; OHM, J. E.; GIRARD, L.; SHIGEMATSU, H.; PEYTON, M.; JUROSKE, D.; HUANG, Y.; SALMON, J. S.; KIM, Y. H.; POLLACK, J. R.; YANAGISAWA, K.; GAZDAR, A.; MINNA, J. D.; KURIE, J. M. AND CARBONE, D. P. Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 1, p. 226–235, 2005.

AMARAL, J. B. DO; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v. 34, p. 1–20, 2011.

AMARAL, J. B. DO; REZENDE-TEIXEIRA, P.; FREITAS, V. M.; MACHADO-SANTELLI, G. M. MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. **Tissue engineering**, v. 17, n. 11, p. 1097–1107, 2011.

AMARAL, J. B. DO; URABAYASHI, M. S.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Cell death and lumen formation in spheroids of MCF-7 cells. **Cell biology international**, v. 34, n. 3, p. 267–274, 2010.

ARTEAGA, C. L.; ENGELMAN, J. A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. **Cancer cell**, v. 25, n. 3, p. 282–303, 2014.

ASAMI, K.; ATAGI, S. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for non-small cell lung cancer. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 4, p. 646–659, 2014.

BARR, S.; THOMSON, S.; BUCK, E.; RUSSO, S.; PETTI, F.; SUJKA-KWOK, I.; EYZAGUIRRE A.; ROSENFELD-FRANKLIN, M.; GIBSON, N. W.; MIGLARESE, M.; EPSTEIN, D.; IWATA, K. K.; HALEYET, J. D. Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions. **Clinical & experimental metastasis**, v. 25, n. 6, p. 685–693, 2008.

BEGUINOT, L.; LYALL, R. M.; WILLINGHAM, M. C.; PASTAN, I. Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 8, p. 2384–2388, 1984.

BLANCO, R.; IWAKAWA, R.; TANG, M.; KOHNO, T.; ANGULO, B.; PIO, R.; MONTUENGA, L.M.; MINNA, J. D.; YOKOTA, J. AND SANCHEZ- CESPEDES, M. A Gene-Alteration Profile of Human Lung Cancer Cell Lines. **Human Mutation**, v. 30, n. 8, p. 1199–1206, 2010.

BOKHARI, M.; CARNACHAN, R. J.; CAMERON, N. R.; PRZYBORSKI, S. A. Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. **Journal of anatomy**, v. 211, n. 4, p. 567–576, 2007.

BONALDO, M.F.; PESTANO M.C.; RIBEIRO M.C.; MACHADO-SANTELLI G.M.; MORI L. O. A. Comparative characterization of a human large cell lung carcinoma cell line and the xenograft derived cell line. **Cell biology International Reports**, p. 229–241, 1991.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

BOST, F.; MCKAY, R.; DEAN, N.; MERCOLA, D. The JUN kinase/stress-activated protein kinase pathway is required for epidermal growth factor stimulation of growth of human A549 lung carcinoma cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 52, p. 33422–33429, 1997.

BRABENDER, J.; DANENBERG, K. D.; METZGER, R.; SCHNEIDER, P. M.; PARK, J.; SALONGA, D.; HOÛLSCHER, A. H. AND DANENBERG, P. V. Advances in Brief Epidermal Growth Factor Receptor and HER2-neu mRNA Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Is Correlated with Survival. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 1850–1855, 2001.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of molecular endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169–193, 2000.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of molecular endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23–39, 2002.

CAINO, M. C.; LOPEZ-HABER, C.; KISSIL, J. L.; KAZANIETZ, M. G. Non-small cell lung carcinoma cell motility, rac activation and metastatic dissemination are mediated by protein kinase C epsilon. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31714, 2012.

CAPDEVILA, J.; ELEZ, E.; MACARULLA, T.; RAMOS, F. J.; RUIZ-ECHARRI, M.; TABERNERO, J.. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. **Cancer treatment reviews**, v. 35, n. 4, p. 354–363, 2009.

CAREY, K. D.; GARTON, A. J.; ROMERO, M. S.; KAHLER, J.; THOMSON, S.; ROSS, S.; PARK, F.; HALEY, J. D.; GIBSON, N. AND MARK X. SLIWKOWSKI. Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. **Cancer research**, v. 66, n. 16, p. 8163–8171, 2006.

CARPENTER G.; KING L. J.; Cohen S. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. **Nature**, v. 276, n. 5686, p. 409–410, 1978.

CARPENTER, G. The EGF receptor : a nexus for trafficking and signaling. **Bioessays**, v. 22, p. 697–707, 2000.

CARPENTER, G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 143–148, 2003.

CARPENTER, G.; KENNETH, J. L.; MARTIM, M. M. AND COHEN S. Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 11, p. 4297–4304, 1975.

CHEN, Z.; FILLMORE, C. M.; HAMMERMAN, P. S.; KIM, C. F.; WONG, K.-K. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 8, p. 535–546, 2014.

CHENG, C. -Y.; KUO, C. -T.; LIN, C. -C.; HSIEH, H. -L.; YANG, C. -M. IL-1beta induces expression of matrix metalloproteinase-9 and cell migration via a c-Src-dependent, growth factor receptor transactivation in A549 cells. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1595–1610, 2010.

CHITCHOLTAN, K.; ASSELIN, E.; PARENT, S.; SYKES, P. H.; EVANS, J. J. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. **Experimental cell research**, v. 319, n. 1, p. 75–87, 2013.

CHUN, J.; KIM, Y. S. Platycodin D inhibits migration, invasion, and growth of MDA-MB-231 human breast cancer cells via suppression of EGFR-mediated Akt and MAPK pathways. **Chemico-biological interactions**, v. 205, n. 3, p. 212–221, 2013.

COHEN, S. Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 6, p. 1555-1562, 1962.

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

CORTEZ, B. D. A.; QUASSOLLO, G.; CACERES, A.; MACHADO-SANTELLI, G. M. The fate of chrysothole-induced multipolar mitosis and aneuploid population in cultured lung cancer cells. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18600, 2011.

CUKIERMAN, E.; PANKOV, R.; STEVENS, D. R.; YAMADA, K. M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1708-1712, 2001.

DAVIDSON, M. R.; GAZDAR, A. F.; CLARKE, B. E. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. **Journal of thoracic disease**, v. 5 Suppl 5, p. S463-S478, 2013.

DENLINGER, C. E.; IKONOMIDIS, J. S.; REED, C. E.; SPINALE, F. G. Epithelial to mesenchymal transition: the doorway to metastasis in human lung cancers. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 140, n. 3, p. 505-513, 2010.

DOWNWARD J.; YARDEN Y.; MAYES E.; SCRACE G.; TOTTY N.; STOCKWELL P.; ULLRICH A.; SCHLESSINGER J. W. M. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. **Nature**, v. 307, n. 5951, p. 521-527, 1984.

EBERHARD, D. A.; GIACCONE, G.; JOHNSON, B. E. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. **Journal of clinical oncology**, v. 26, n. 6, p. 983-994, 2008.

EKERT, J. E.; JOHNSON, K.; STRAKE, B.; PARDINAS, J.; JARANTOW, S.; PERKINSON, R.; COLTER, D. C. Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic compound responsiveness in vitro--implication for drug development. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92248, 2014.

ENOMOTO, A.; MURAKAMI, H.; ASAI, N.; MORONE, N.; WATANABE, T.; KAWAI, K.; MURAKUMO, Y.; USUKURA, J.; KAIBUCHI, K. AND MASAHIDE TAKAHASHI. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. **Developmental cell**, v. 9, n. 3, p. 389-402, 2005.

ERICKSON, S. L.; SHEA, K. S. O.; GHABOOSI, N.; LOVERRO, L.; FRANTZ, G.; BAUER, M.; LU, L. H. AND MOORE, M. W. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development : a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. **Development**, v. 124, p. 4999-5011, 1997.

FERGUSON, K. M.; BERGER, M. B.; MENDROLA, J. M.; CHO, H. -S.; LEAHY, D. J.; LEMMON, M. A. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. **Molecular Cell**, v. 11, p.507-517, 2003.

FERLAY, J.; AUTIER, P.; BONIOL, M.; HEANUE, M.; COLOMBET, M. AND BOYLE, P.. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. **Annals of oncology**, v. 18, n. 3, p. 581-592, 2007.

FREITAS, V. M.; RANGEL, M.; BISSON, L. F.; JAEGER, R. G.; MACHADO-SANTELLI, G. M. The geodiamolide H, derived from Brazilian sponge *Geodia corticostylifera*, regulates actin cytoskeleton, migration and invasion of breast cancer cells cultured in three-dimensional environment. **Journal of cellular physiology**, v. 216, n. 3, p. 583-594, 2008.

FRIEDMAN, L. M.; RINON, A.; SCHECHTER, B.; LYASS, L.; LAVI, S.; BACUS, S. S.; SELA, M. AND YARDEN, Y. Synergistic down-regulation of receptor tyrosine kinases by combinations of mAbs: implications for cancer immunotherapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 6, p. 1915-1920, 2005.

FRIEDRICH, J.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids-old hat or new challenge? **International journal of radiation biology**, v. 83, n. 11-12, p. 849–871, 2007.

GAN, Y.; SHI, C.; INGE, L.; HIBNER, M.; BALDUCCI, J. AND HUAND, Y.. Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 29, n. 35, p. 4947–4958, 2010.

GANDARA, D.; NARAYAN, S.; LARA, P. N.; GOLDBERG, Z.; DAVIES, A.; LAU, D. H. M.; MACK, F.; GUMERLOCK, P.; VIJAYAKUMAR, S.. Integration of Novel Therapeutics into Combined Modality Therapy of Locally Advanced Non – Small Cell Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 5057–5062, 2005.

GANDHI, J.; ZHANG, J.; XIE, Y.; SOH, J.; SHIGEMATSU, H.; ZHANG, W.; YAMAMOTO, H.; PEYTON, M.; GIRARD, L.; LOCKWOOD, W. W.; LAM, W. L.; VARELLA-GARCIA, M.; MINNA, J. D.; GAZDAR, A. F. Alterations in genes of the EGFR signaling pathway and their relationship to EGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer cell lines. **PLoS one**, v. 4, n. 2, p. e4576, 2009.

GAO, H.; CHEN, X.; DU, X.; GUAN, B.; LIU, Y.; ZHANG, H. EGF enhances the migration of cancer cells by up-regulation of TRPM7. **Cell calcium**, v. 50, n. 6, p. 559–568, 2011.

GASSMANN, M.; CASAGRANDA, F.; ORIOLI, D.; SIMON, H.; LAI, C.; KLEIN, R. G. L. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. **Nature**, v. 378, p. 390–394, 1995.

GSCHWIND, A.; FISCHER, O. M.; ULLRICH, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. **Nature Reviews**, v. 4, May, p. 361–370, 2004.

GUO, A.; VILLÉN, J.; KORNHAUSER, J.; LEE, K. A.; STOKES, M. P.; RIKOVA, K.; POSSEMATO, A.; NARDONE, J.; INNOCENTI, G.; WETZEL, R.; WANG, Y.; MACNEILL, J.; MITCHELL, J.; GYGI, S. P.; RUSH, J.; POLAKIEWICZ, R. D. AND COMB, M. J. Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 2, p. 692–697, 2008.

HALL, H. G.; FARSON, D. A; BISSELL, M. J. Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: a morphogenetic model in culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 15, p. 4672–4676, 1982.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARTMAN, Z. R.; SCHALLER, M. D.; AGAZIE, Y. M. The tyrosine phosphatase SHP2 regulates focal adhesion kinase to promote EGF-induced lamellipodia persistence and cell migration. **Molecular cancer research**, v. 11, n. 6, p. 651–664, 2013.

HAUPTMANN, S.; DENKERT, C.; LÖHRKE, H. Integrin expression on colorectal tumor cells growing as monolayers, as multicellular tumor spheroids, or in nude mice. **International journal of cancer**, v. 61, n. 6, p. 819–825, 1995.

HERBST, ROY S.; SHIN, D. M. Monoclonal Antibodies to Target Epidermal Growth Factor Receptor – Positive Tumors A New Paradigm for Cancer Therapy. **Cancer**, v. 94, n.5, p. 1593-1611 ,2002.

HIRSCH, F. R.; VARELLA-GARCIA, M.; BUNN, P. A; MARIA, M. V.; VEVE, R.; BREMNES, R. M.; BARÓN, A. E.; ZENG, C. AND FRANKLIN A. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. **Journal of clinical oncology**, v. 21, n. 20, p. 3798–3807, 2003.

HIRSCH, F. R.; VARELLA-GARCIA, M.; MCCOY, J.; WEST, H.; XAVIER, A. C.; GUMERLOCK, P.; BUNN, P. A.; FRANKLIN, W. A.; CROWLEY, J.; GANDARA, D. R. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. **Journal of clinical oncology**, v. 23, n. 28, p. 6838–6845, 2005.

HIRSCHHAEUSER, F.; MENNE, H.; DITTFELD, C.; WEST, J.; MUELLER-KLIESER, W.; KUNZ-SCHUGHART, L. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. **Journal of biotechnology**, v. 148, n. 1, p. 3–15, 2010.

HOFMAN, E. G.; BADER, A. N.; VOORTMAN, J.; HEUVEL, D. J.; SIGISMUND, S.; VERKLEIJ, A. J.; GERRITSEN, H. C. AND BERGEN EM HENEGOUWEN, P. M. P. Ligand-induced EGF receptor oligomerization is kinase-dependent and enhances internalization. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 50, p. 39481–39489, 2010.

HOLZ, C.; NIEHR, F.; BOYKO, M.; HRISTOZOVA, T.; DISTEL, L.; BUDACH, V.; TINHOFER, I. Epithelial-mesenchymal-transition induced by EGFR activation interferes with cell migration and response to irradiation and cetuximab in head and neck cancer cells. **Radiotherapy and oncology**, v. 101, n. 1, p. 158–164, 2011.

HOU, M. F.; KUO, H. C.; LI, J. H.; WANG, Y.; CHANG, C.; CHEN, C.; CHEN, W.; CHIU, C.; YANG, S.; CHANG, W. Orai1/CRACM1 overexpression suppresses cell proliferation via attenuation of the store-operated calcium influx-mediated signalling pathway in A549 lung cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 12, p. 1278–1284, 2011.

HSIEH, C. Y.; TSAI, P. C.; TSENG, C. H.; CHEN, Y.; CHANG, L.; LIN, S. et al. Inhibition of EGF/EGFR activation with naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione blocks migration and invasion of MDA-MB-231 cells. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 1, p. 1–10, 2013.

HUANG, C.; JACOBSON, K.; SCHALLER, M. D. MAP kinases and cell migration. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 20, p. 4619–4628, 2004.

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

HUNTER, T.; COOPER, A.; DIEGO, S. Rapid Tyrosine Phosphorylation of Proteins in A431 Human Tumor Cells. **Cell**, v. 24, n. 3, p. 741–752, 1981.

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

IVASCU, A.; KUBBIES, M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. **Journal of biomolecular screening**, v. 11, n. 8, p. 922–932, 2006.

JARAMILLO, M. L.; BANVILLE, M.; COLLINS, C.; PAUL-ROC, B.; BOURGET, L. AND O'CONNOR-MCCOURT, M. Differential sensitivity of A549 non-small lung carcinoma cell responses to epidermal growth factor receptor pathway inhibitors. **Cancer biology & therapy**, v. 7, n. 4, p. 557–568, 2008.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics. **CA Cancer journal clinical**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, TY.; XU, J.; THUN, M. J. Cancer Statistics, 2009. **CA Cancer journal clinical**, v. 59, n. 4, p. 225–249, 2009.

JEMAL, A.; THUN, M. J.; RIES, L. A. G.; WEIR, H. K.; CENTER, M. M.; WARD, E.; WU, X.; EHEMAN, C.; ANDERSON, R.; AJANI, U. A.; KOHLER, B. AND EDWARDS, B. K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 23, p. 1672–1694, 2008.

JIANG, Q. I. N.; ZHOU, C.; BI, Z.; WAN, Y. EGF-Induced Cell Migration Is Mediated by ERK and PI3K/AKT Pathways in Cultured Human Lens Epithelial Cells. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 93-102, 2006.

JORISSEN, R. N.; WALKER, F.; POULIOT, N.; GARRET, T. P. J.; WARD, C. W. AND BURGESS, A. W. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. **Experimental Cell Research**, v. 284, n. 1, p. 31–53, 2003.

KENNY, P. A.; LEE, G. Y.; MYERS, C. A.; NEVE, R. M.; SEMEIKS, J. R.; SPELLMAN, P. T.; LORENZ, K.; LEE, E. H.; BARCELLOS-HOFF, M. H.; PETERSEN, O. W.; GRAY, J. W. AND BISSEL, M. J. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. **Molecular oncology**, v. 1, n. 1, p. 84–96, 2007.

KRAMER, N.; WALZI, A.; UNGER, C.; ROSNER, M.; KRUPITZA, G.; HENGSTSCHLÄGER, M. AND DOLZNING, H. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation Research**, v. 752, p. 10-24, 2013.

LEE, J.; RYU, S.-H.; KANG, S. M. Prevention of bronchial hyperplasia by EGFR pathway inhibitors in an organotypic culture model. **Cancer prevention research**, v. 4, n. 8, p. 1306–1315, 2011.

LEE, K. F.; SIMON, H.; CHEN, H.; BATES, B.; HUNG, M. C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. **Nature**, v. 378, p. 394–398, 1995.

LEWIS A. T. S.; SHAPIRO P. S. Signal transduction through MAP kinase cascades. **Advances in Cancer Research**, v. 74, p. 49–139, 1998.

LI, C.; NGUYEN, H. T.; ZHUANG, Y. Comparative profiling of miRNA expression of lung adenocarcinoma cells in two-dimensional and three-dimensional cultures. **Gene**, v. 511, n. 2, p. 143–150, 2012.

LI, X.; ISHIHARA, S.; YASUDA, M.; NISHIOKA, T.; MIZUTANI, T.; ISHIKAWA, M.; KAWABATA, K.; SHIRATO, H AND HAGA, H. Lung cancer cells that survive ionizing radiation show increased integrin $\alpha 2\beta 1$ - and EGFR-dependent invasiveness. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e70905, 2013.

LIAO, H.; CARPENTER, G. Role of the Sec61 Translocon in EGF Receptor Trafficking to the Nucleus and Gene Expression. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 3, p. 1064–1072, 2007.

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

LINGGI, B.; CARPENTER, G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. **Trends in cell biology**, v. 16, n. 12, p. 649–656, 2006.

LIU, Z.; CHEN, X.; SONG, H.; et al. Snail regulated by PKC/GSK-3 β pathway is crucial for EGF-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells. **Cell and tissue research**, v. 358, n. 2, p. 491–502, 2014.

LONGATI, P.; JIA, X.; EIMER, J.; et al. 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. **BMC cancer**, v. 13, p. 1-13, 2013.

LU, Z.; GHOSH, S.; WANG, Z.; HUNTER, T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. **Cancer Cell**, v. 4, n. 6, p. 499–515, 2003.

LUCA, A. C.; MERSCH, S.; DEENEN, R.; SCHMIDT, S.; MESSNER, I.; SCHAFER, L.; BALDUS, S. E.; HUCKENCECK, W.; PIEKORZ, R. P.; KNOEFEL, W. T.; KRIEG, A. AND STOECKLEIN, N. H. Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. **PLoS one**, v. 8, n. 3, p. e59689, 2013.

LURJE, G.; LENZ, H.-J. EGFR signaling and drug discovery. **Oncology**, v. 77, n. 6, p. 400–410, 2009.

LYNCH, T.J.; BELL, D.W.; SORDELLA, R.; GURUBHAGAVATULA, S.; OKIMOTO, R.A.; BRANNIGAN, B.W.; HARRIS, P.L.; HASERLAT, S.M.; SUPKO, J.G.; HALUSKA, F.G.; LOUIS, D.N.; CHRISTIANI, D.C.; SETTLEMAN, J.; Haber D. A. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. **The new England journal of medicine**, v.35, n. 21, p. 2129–2139, 2004.

MAEGAWA, M.; TAKEUCHI, K.; FUNAKOSHI, E.; KAWASAKI, K.; NISHIO, K.; SHIMIZU, N. AND ITO, F.. Growth stimulation of non-small cell lung cancer cell lines by antibody against epidermal growth factor receptor promoting formation of ErbB2/ErbB3 heterodimers. **Molecular cancer research**, v. 5, n. 4, p. 393–401, 2007.

MAGNUSON, T.; THREADGILL, D. W.; DLUGOSZ, A. A.; HANSEN, L. A.; TENNENBAUM, T.; LICHTI, U.; YEE, D.; LAMANTIA, C.; MOURTON, T.; HERRUP, K.; HARRIS, R. C.; BARNARD, J. A.; YUSPA, S. H.; COFFEY, R. J. AND MAGNUSON, T. Targeted Disruption of Mouse EGF Receptor: Effect of Genetic Background on Mutant Phenotype. **Science**, v. 269, n. 5221, p. 230-234, 1995.

MANELLI-OLIVEIRA, R. Cytoskeletal and nuclear alterations in human lung tumor cells : a confocal microscope study. **Histochem cell biology**, v. 115, n. 5, p. 403–411, 2001.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261–1274, 2007.

MANSBRIDGE J.N.; KNUCHEK R.; KNAPP A.M.; SUTHERLAND R. M. Importance of tyrosine phosphatases in the effects of cell-cell contact and microenvironments on EGF-stimulated tyrosine phosphorylation. **Journal of cellular physiology**, v. 151, n. 3, p. 433–442, 1992.

MATIKAS, A.; MISTRITIS, D.; GEORGOULIAS, V.; KOTSAKIS, A. Current and Future Approaches in the Management of Non-Small-Cell Lung Cancer Patients With Resistance to EGFR TKIs. **Clinical lung cancer**, v.16, n. 4, p. 253-261, 2015.

MAXWELL, D. P. Global cancer statistics in the year 2000. **The lancet oncology**, v. 2, n. 9, p. 533–543, 2001.

MIETTINEN. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. **Nature**, v. 376, n. 27, p. 337–341, 1995.

MILLER, V. A. EGFR mutations and EGFR tyrosine kinase inhibition in non-small cell lung cancer. **Seminars in oncology nursing**, v. 24, n. 1, p. 27–33, 2008.

MISHRA, D. K.; SAKAMOTO, J. H.; THRALL, M. J.; BAIRD, B.; BLACKMON, S.; FERRARI, M.; KURIE, J. M. AND KIM, M. P. Human lung cancer cells grown in an ex vivo 3D lung model produce matrix metalloproteinases not produced in 2D culture. **PLoS one**, v. 7, n. 9, p. e45308, 2012.

MITSUDOMI, T. Advances in target therapy for lung cancer. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 40, n. 2, p. 101–106, 2010.

MOISEEVA, E. P.; FOX, L. H.; HOWELLS, L. M.; TEMPLE, L. A F.; MANSON, M. M. Indole-3-carbinol-induced death in cancer cells involves EGFR downregulation and is exacerbated in a 3D environment. **Apoptosis**, v. 11, n. 5, p. 799–812, 2006.

MOUSTAFA A. A. -E.; ACHKHAR A.; YASMEEN. A. EGF-receptor signaling and epithelial-mesenchymal transition in human carcinomas. **Frontiers in bioscience**, v.4, p. 671–684, 2012.

MUTHUSAMI, S.; PRABAKARAN, D. S.; YU, J.-R.; PARK, W.-Y. EGF-induced expression of Fused Toes Homolog (FTS) facilitates epithelial-mesenchymal transition and promotes cell migration in ME180 cervical cancer cells. **Cancer letters**, v. 351, n. 2, p. 252–259, 2014.

NGUYEN, H. T.; ZHUANG, Y.; SUN, L.; KANTROW, S. P.; KOLLS, J. K.; YOU, Z.; ZHOU, Y. AND SHAN, B. Src-mediated morphology transition of lung cancer cells in three-dimensional organotypic culture. **Cancer cell international**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2013.

NIERO, E.; ROCHA-SALES, B.; LAUAND, C.; CORTEZ, B. A.; SOUZA, M. M.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; URUBAYASHI, M. S.; MARTENS, A. A.; NEVES, J. H. AND MACHADO-SANTELLI, G. M. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 1, p. 1-14, 2014.

NIRMALANANDHAN, V. S.; DUREN, A.; HENDRICKS, P.; VIELHAUER, G.; SITTAMPALAM, G. S. Activity of anticancer agents in a three-dimensional cell culture model. **Assay and drug development technologies**, v. 8, n. 5, p. 581–590, 2010.

NISHIMURA, Y.; BERECZKY, B.; ONO, M. The EGFR inhibitor gefitinib suppresses ligand-stimulated endocytosis of EGFR via the early/late endocytic pathway in non-small cell lung cancer cell lines. **Histochemistry and cell biology**, v. 127, n. 5, p. 541–553, 2007.

OKABE, T.; OKAMOTO, I.; TAMURA, K.; TERASHIMA, M.; YOSHIDA, T.; SATOH, T.; TAKADA, M.; FUKUOKA, M. AND NAKAGAWA, K. Differential constitutive activation of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification. **Cancer research**, v. 67, n. 5, p. 2046–2053, 2007.

OLABIRAN, Y.; LEDERMANN, J. A; MARSTON, N. J.; BOXER, G. M.; HICKS, R.; SOUHAMI, R. L.; SPIRO, S. G. AND STAHEL, R. A. The selection of antibodies for targeted therapy of small-cell lung cancer (SCLC) using a human tumour spheroid model to compare the uptake of cluster 1 and cluster w4 antibodies. **British journal of cancer**, v. 69, n. 2, p. 247–252, 1994.

OLIVEIRA, S.; SCHIFFELERS, R. M.; VEEKEN, J. VAN DER; MELL, R. V. D.; VONGPROMEK, R.; HENEGOUWEN, P. M. P.; STORM, G. AND ROOVERS, R. C. Downregulation of EGFR by a novel multivalent nanobody-liposome platform. **Journal of controlled release**, v. 145, n. 2, p. 165–175, 2010.

PAEZ, J. G.; JA, P. A.; TRACY, S.; GREULICH, H.; GABRIEL, S.; HERMAN, P.; KAYE, F. J.; LINDEMAN, N.; BOGGON, T. J.; NAOKI, K.; SASAKI, H.; FUJII, Y.; ECK, M. J.; SELLERS, W. R.; JOHNSON, B. E. AND MEYERSON, M. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. **Science**, v. 304, n.5676, p. 1497–1500, 2004.

PAGE, H.; FLOOD, P.; REYNAUD, E. G. Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. **Cell and tissue research**, v. 352, n. 1, p. 123–131, 2013.

PAO, W.; CHMIELECKI, J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. **Nature review cancer**, v. 10, p. 760-774, 2010.

PAO, W.; MILLER, V. A; POLITI, K. A; RIELY, G. J.; SOMWAR, R.; ZAKOWSKI, M. F.; KRIS, M. G. AND VARMUS, H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. **PLoS medicine**, v. 2, n. 3, p. 1-33, 2005.

PAO, W.; MILLER, V.; ZAKOWSKI, M.; DOHERTY, J.; POITI, K.; SARKARIA, I.; SINGH, B.; HEELAN, R.; RUSCH, V.; FULTON, L.; MARDIS, E.; KUPFER, D.; WILSON, R.; KRIS, M. AND VARMUS H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from never smokers and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 101, n. 36, p. 13306-13311, 2004.

PETER, Y.; COMELLAS, A.; LEVANTINI, E.; INGENITO, E. P.; STEVEN, D. Epidermal growth factor receptor and claudin-2 participate in A549 permeability and remodeling: implications for non-small cell lung cancer tumor colonization. **Molecular Carcinogenesis**, v. 48, n. 6, p. 488-497, 2009.

PREET, A; GANJU, R. K.; GROOPMAN, J. E. Delta9-Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo. **Oncogene**, v. 27, n. 3, p. 339-346, 2008.

PRESTWICH, G. D. Evaluating drug efficacy and toxicology in three dimensions: using synthetic extracellular matrices in drug discovery. **Accounts of chemical research**, v. 41, n. 1, p. 139-148, 2008.

PURI, N.; SALGIA, R. Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer. **Journal of carcinogenesis**, v. 7, n. 9, p. 1-8, 2008.

QIU, Q.; YANG, M.; TSANG, B. K.; GRUSLIN, A. Both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are required in epidermal growth factor-induced human trophoblast migration. **Molecular human reproduction**, v. 10, n. 9, p. 677-684, 2004.

ROSA, M. R. P. DA; FALCÃO, A. S. C.; FUZII, H. T.; KATAOKA, M. S. S.; RIBEIRO, A. L. R.; BOCCARDO, E.; SIQUEIRA, A. S.; JAEGER, R. G.; PINHEIRO, J. J. V. AND JÚNIOR, S. M. A. EGFR signaling downstream of EGF regulates migration, invasion, and MMP secretion of immortalized cells derived from human ameloblastoma. **Tumour biology**, v. 35, n. 11, p. 11107-11120, 2014.

ROWLEY, J. A.; MADLAMBAYAN, G.; MOONEY, D. J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. **Biomaterials**, v. 20, p. 45-53, 1999.

SAFDARI, Y.; KHALILI, M.; EBRAHIMZADEH, M. A.; YAZDANI, Y.; FARAJNIA, S. Natural inhibitors of PI3K/AKT signaling in breast cancer: Emphasis on newly-discovered molecular mechanisms of action. **Pharmacological research**, v. 93, p. 1-10, 2014.

SANTINI, M. T.; RAINALDI, G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. **Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, v. 67, n. 3, p. 148-157, 1999.

SANTINI, M. T.; RAINALDI, G.; INDOVINA, P. L. Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 36, n. 2-3, p. 75-87, 2000.

SCHLESSINGER, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. **Cell**, v. 103, p. 211-225, 2000.

SCHLESSINGER, J. Common and Distinct Elements in Cellular Signaling via EGF and FGF Receptors. **Science**, v. 306, n. November, p. 1506-1508, 2004.

SEKIDO, Y.; FONG, K. M.; MINNA, J. D. Molecular genetics of lung cancer. **Annual review of medicine**, v. 54, p. 73-87, 2003.

SEQUIST, L. V; LYNCH, T. J. EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: an evolving story. **Annual review of medicine**, v. 59, p. 429-442, 2008.

SHARMA, S. V; SETTLEMAN, J. ErbBs in lung cancer. **Experimental cell research**, v. 315, n. 4, p. 557-571, 2009.

SIBILIA, M.; ERWIN, F. Strain-Dependent Epithelial Defects in Mice Lacking the EGF Receptor. **Science**, v. 269, p. 234-238, 1993.

SONG, H. -H. G.; PARK, K. M.; GERECHT, S. Hydrogels to model 3D in vitro microenvironment of tumor vascularization. **Advanced drug delivery reviews**, v. 79-80, p. 19-29, 2014.

SORKIN, A.; ZASTROW, M. VON. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 3, n. 8, p. 600-614, 2002.

SPENCER, V. A; XU, R.; BISSELL, M. J. Gene expression in the third dimension: the ECM-nucleus connection. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 15, n. 1, p. 65-71, 2010.

STOMMEL, J. M.; KIMMELMAN, A. C.; YING, H.; NABIOULLIN, R.; PONUGOTI, A. H.; WIEDEMEYER, R.; STEGH, A. H.; BRADNER, J. E.; LIGON, K. L.; BRENNAN, C.; CHIN, L. AND DEPINHO, R. A. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 287-290, 2007.

STOSCHECK, C. M.; CARPENTER, G. Down Regulation of Epidermal Growth Factor Receptors : Fibroblasts Direct Demonstration of Receptor Degradation in Human. **The Journal of cell biology**, v. 98, p. 1048-1053, 1984.

STRATMANN, A. T.; FECHER, D.; WANGORSCH, G.; GOTTLICH, C.; WALLWS, T.; WALLS, H.; DANDEKAR, T.; DANDEKAR, G. AND NIETZER S. L. Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean in silico model. **Molecular Oncology**, v. 8, n.2, p. 351-365, 2014.

SZOT, C. S.; BUCHANAN, C. F.; FREEMAN, J. W.; RYLANDER, M. N. 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. **Biomaterials**, v. 32, n. 31, p. 7905-7912, 2011.

TIDOW, N.; BOECKER, A.; SCHMIDT, H.; et al. Distinct Amplification of an Untranslated Regulatory Sequence in the egfr Gene Contributes to Early Steps in Breast Cancer Development. **Cancer Research**, v. 63, p. 1172-1178, 2003.

TOKUMO, M.; TOYOOKA, S.; ICHIHARA, S.; OHASHI, K.; TSUKUDA, K.; ICHIMURA, K.; TABATA, M.; KIURA, K.; AOE, M.; SANO, Y.; DATE, H. AND SHIMIZU, N. Double mutation and gene copy number of EGFR in gefitinib refractory non-small-cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 53, n. 1, p. 117-121, 2006.

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

VARELLA-GARCIA, M. Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: the EGFR fluorescence in situ hybridization assay. **Diagnostic pathology**, v. 1, p. 1-10, 2006.

WALEH, N. S.; GALLO, J.; GRANT, T. D.; MURPHY, B. J.; KRAMER, R. H. AND SUTHERLAND, R. M. Selective Down-Regulation of Integrin Receptors in Spheroids of Squamous Cell Carcinoma Selective Down-Regulation of Integrin Receptors in Spheroids of Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Research**, v. 54, p. 838-843, 1994.

WANG, S.; LI, E.; GAO, Y.; WANG, Y.; GUO, Z.; HE, J.; ZHANG, J.; GAO, Z. AND WANG, Q. Study on invadopodia formation for lung carcinoma invasion with a microfluidic 3D culture device. **PLoS one**, v. 8, n. 2, p. e56448, 2013.

WANG, Y.; MINOSHIMA, S.; SHIMIZU, N. Precise mapping of the EGF receptor gene on the human chromosome 7p12 using an improved fish technique. **The Japanese Journal Of Human Genetics**, v. 38, n. 4, p. 399-406, 1993.

WHEATLEY-PRICE, P.; SHEPHERD, F. A. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of lung cancer : reality and hopes. **Current Opinion in Oncology**, v. 20 p. 162-175, 2008.

WILLIAM, O. L. E.; RNNOV-JESSEN, L.; HOWLETTT, A. R.; BISSELLT, M. J. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. **Cell Biology**, v. 89, p. 9064-9068 ,1992.

WONG, C.; VOSBURGH, E.; LEVINE, A. J.; CONG, L.; XU, E. Y. Human neuroendocrine tumor cell lines as a three-dimensional model for the study of human neuroendocrine tumor therapy. **Journal of visualized experiments**, n. 66, p. e4218, 2012.

XIANG, X.; PHUNG, Y.; FENG, M.; NAGASHIMA, K.; ZHANG, J.; BROADDUS, V. C.; HASSAN, R.; FITZGERALD, D. AND HO, M. The development and characterization of a human mesothelioma in vitro 3D model to investigate immunotoxin therapy. **PloS one**, v. 6, n. 1, p. e14640, 2011.

YANG, L.; PARKIN, D. M.; FERLAY, J.; LI, L.; CHEN, Y. Estimates of Cancer Incidence in China for 2000 and Projections for 2005 Estimates of Cancer Incidence in China for 2000 and Projections for 2005. **Cancer Epidemiology, biomarkers & Prevention**, v. 14, p. 243–250, 2005.

YANG, T.-M.; BARBONE, D.; FENNELL, D. A; BROADDUS, V. C. Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 41, n. 1, p. 14–23, 2009.

YASUDA, H., PARK, E., YUN, C.H., SNG, N.J., LUCENA-ARAUJO, A.R., YEO, W. L.; HUBERMAN, M.S., COHEN, D.W., NAKAYAMA, S., ISHIOKA, K., YAMAGUCHI, N.; HANNA, M.; OXNARD, G. R.; LATHAN, C. S.; MORAN, T.; SEQUIST, L. V.; CHAFT, J. R.; RIELY, G. J.; ARCILA, M. E.; SOO, R. A.; MEYERSON, M.; ECK, M. J.; KOBAYASHI, S. S. AND COSTA, D. B. Structural, biochemical and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 216, p. 1-23, 2013.

YUN, C.-H.; BOGGON, T. J.; LI, Y.; WOO, M. S.; GREULICH, H.; MEYERSON, M. AND ECK, M. J. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. **Cancer cell**, v. 11, n. 3, p. 217–227, 2007.

ZEISEL, A.; YITZHAKY, A.; KOERNER, C.; LAURIOLA, M.; COHEN-DVASHI, H.; KOSTLER, W. J.; YARDEN, Y.; WIEMANN, S. AND DOMANY, E. qCMA: A Desktop Application for Quantitative Collective Cell Migration Analysis. **Journal of biomolecular screening**, v. 18, n.3, p.356-360, 2012.

ZHANG, K.-S.; CHEN, H.-Q.; CHEN, Y.-S.; QIU, K.; ZHENG, X.; LI, G.; YANG, H. AND WEN, C. Bisphenol A stimulates human lung cancer cell migration via upregulation of matrix metalloproteinases by GPER/EGFR/ERK1/2 signal pathway. **Biomedicine & pharmacotherapy** , v. 68, n. 8, p. 1037–1043, 2014.

ZHU, J.; ZHONG, W.; ZHANG, G.; LI, R.; ZHANG, X.; GUO, A.; ZHANG, Y.; AN, S.; MOK, T. S. AND WU, Y. Better survival with EGFR exon 19 than exon 21 mutations in gefitinib-treated non-small cell lung cancer patients is due to differential inhibition of downstream signals. **Cancer letters**, v. 265, n. 2, p. 307–317, 2008.

ANEXO

A - Independent of ErbB1 gene copy number, EGF stimulates migration but is not associated with cell proliferation in non-small cell lung cancer.

Lauand *et al.* *Cancer Cell International* 2013, **13**:38
<http://www.cancer-ci.com/content/13/1/38>



PRIMARY RESEARCH

Open Access

Independent of ErbB1 gene copy number, EGF stimulates migration but is not associated with cell proliferation in non-small cell lung cancer

Camila Lauand, Paula Rezende-Teixeira, Beatriz Araújo Cortez, Evandro Luís de Oliveira Niero and Gláucia Maria Machado-Santelli*

Abstract

Background: Lung cancer often exhibits molecular changes, such as the overexpression of the ErbB1 gene. ErbB1 encodes epidermal growth factor receptor (EGFR), a tyrosine kinase receptor, involved mainly in cell proliferation and survival. EGFR overexpression has been associated with more aggressive disease, poor prognosis, low survival rate and low response to therapy. ErbB1 amplification and mutation are associated with tumor development and are implicated in ineffective treatment. The aim of the present study was to investigate whether the ErbB1 copy number affects EGFR expression, cell proliferation or cell migration by comparing two different cell lines.

Methods: The copies of ErbB1 gene was evaluated by FISH. Immunofluorescence and Western blotting were performed to determine location and expression of proteins mentioned in the present study. Proliferation was studied by flow cytometry and cell migration by wound healing assay and time lapse.

Results: We investigated the activation and function of EGFR in the A549 and HK2 lung cancer cell lines, which contain 3 and 6 copies of ErbB1, respectively. The expression of EGFR was lower in the HK2 cell line. EGFR was activated after stimulation with EGF in both cell lines, but this activation did not promote differences in cellular proliferation when compared to control cells. Inhibiting EGFR with AG1478 did not modify cellular proliferation, confirming previous data. However, we observed morphological alterations, changes in microfilament organization and increased cell migration upon EGF stimulation. However, these effects did not seem to be consequence of an epithelial-mesenchymal transition.

Conclusion: EGFR expression did not appear to be associated to the ErbB1 gene copy number, and neither of these aspects appeared to affect cell proliferation. However, EGFR activation by EGF resulted in cell migration stimulation in both cell lines.

Keywords: Epidermal growth factor receptor, Lung cancer, Epidermal growth factor, Proliferation, Tyrosine kinase inhibitor, Cell migration