

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

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.

INTRODUÇÃO

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).

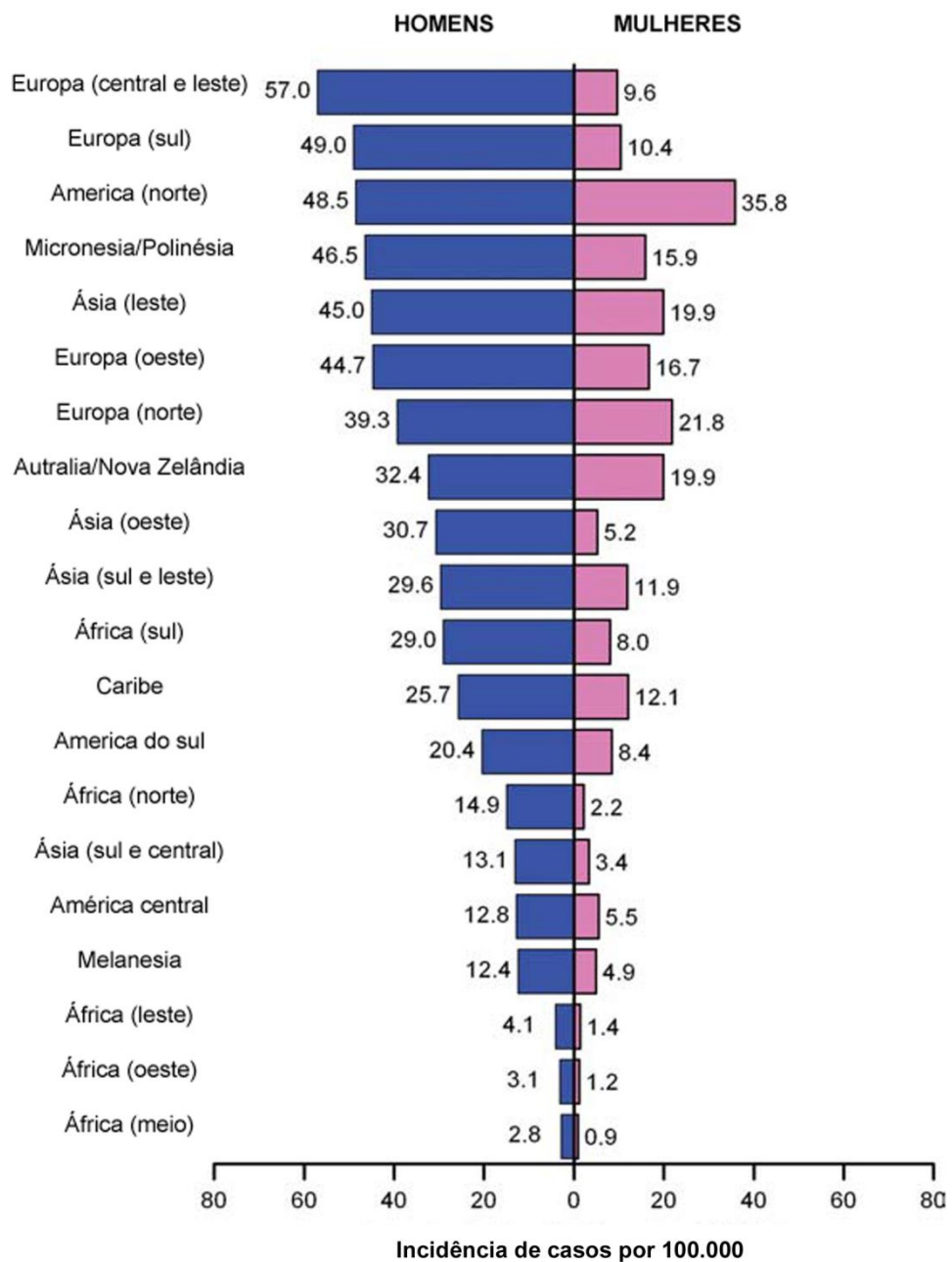
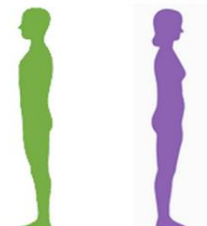


Figura 1 - Incidência do câncer de pulmão no mundo padronizada pela idade e gênero. Fonte: Modificado de JEMAL et al. (2011).

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon 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.

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).

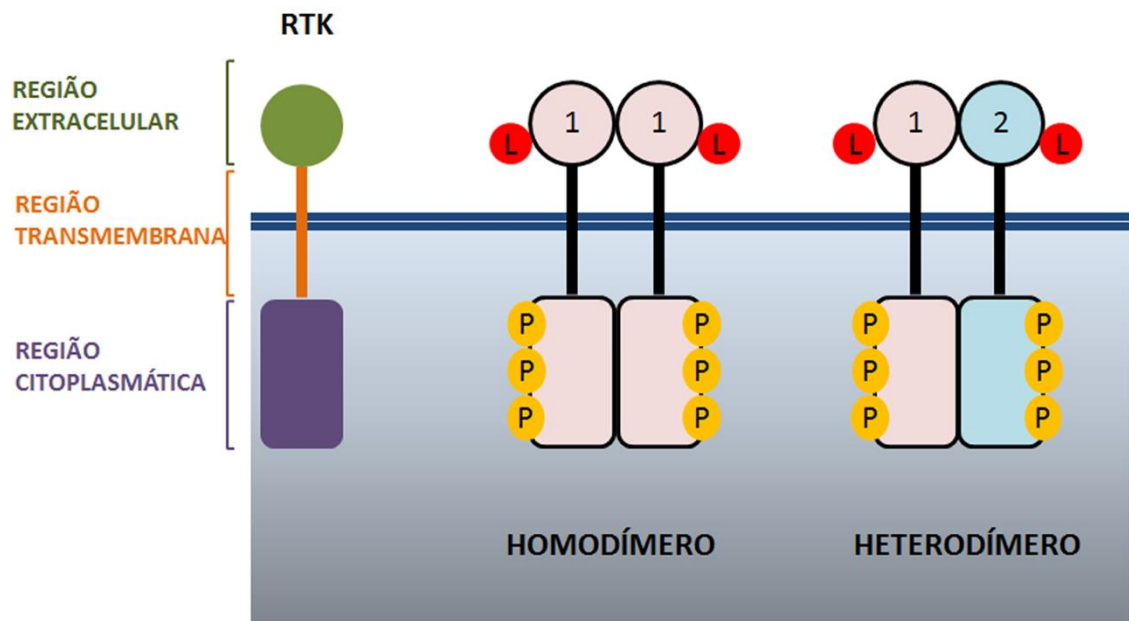


Figura 3 - Regiões da proteína EGFR. O EGFR possui 3 regiões: a região extracelular, a região transmembrana e a região citoplasmática. A ligação do ligante ocorre na região extracelular e promove a formação de homodímeros ou heterodímeros, promovendo assim a fosforilação da região citoplasmática desse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

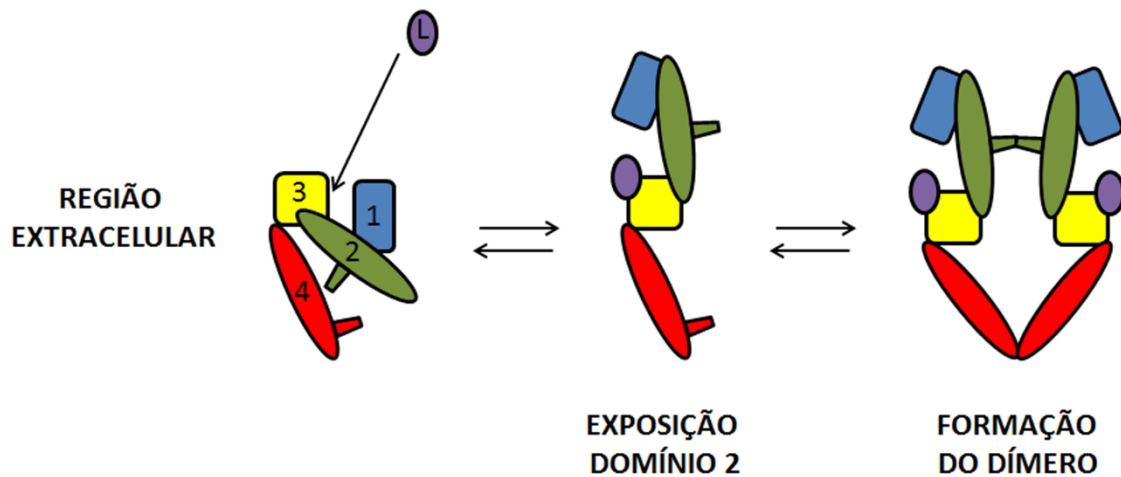


Figura 4 - A região extracelular do EGFR possui 4 domínios. A ligação do ligante ocorre no domínio 3, promovendo uma mudança conformacional no receptor e expondo o domínio 2, promovendo assim a formação do dímero. Fonte: Modificado de Ferguson et al. (2003).

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.

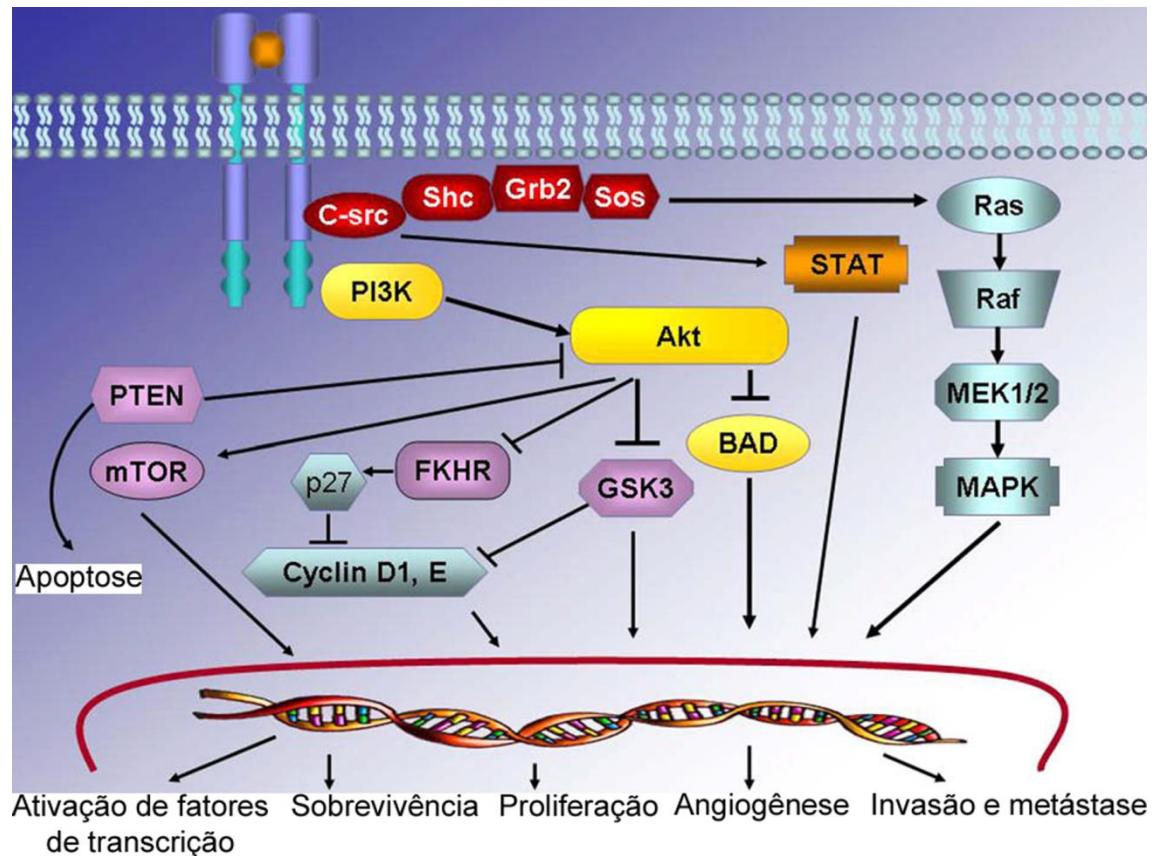


Figura 5 - Cascata de sinalização citoplasmática mediada pela ativação do EGFR. Fonte: Modificado de Capdevila et al. (2009).

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.

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).

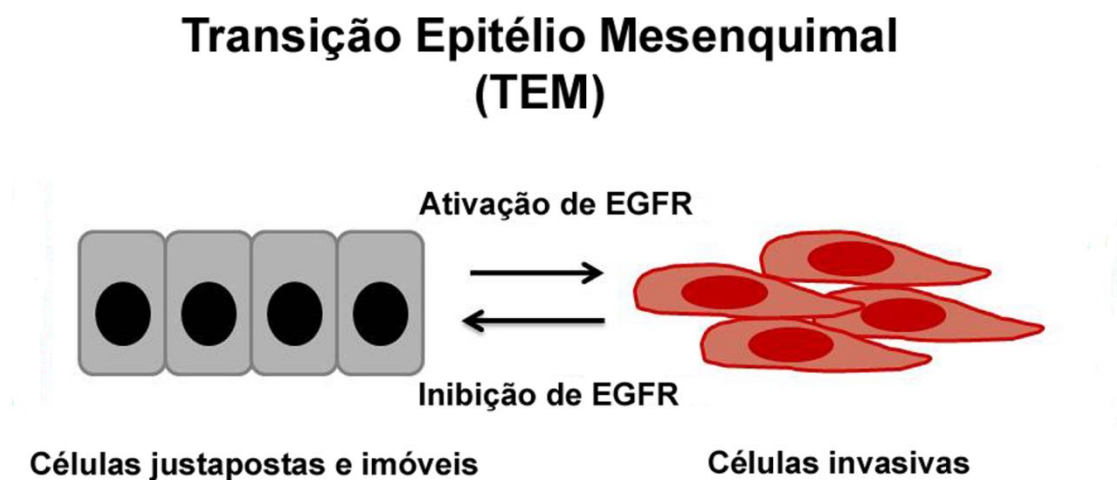


Figura 6 - Transição epitélio mesenquimal (TEM) e a modulação pelo EGFR. A ativação de EGFR altera a diferenciação celular pela indução de TEM acompanhada pela expressão de marcadores mesenquimais como vimentina, fibronectina e N-caderina. Em contraste, a inibição de EGFR por inibidores do domínio tirosina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

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.

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.