

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Helena Flores Mello

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE
EGFR EM CÉLULAS DE GLIOMA DE RATO (C6)**

Porto Alegre

Julho de 2014

Helena Flores Mello

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE
EGFR EM CÉLULAS DE GLIOMA DE RATO (C6)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a Dra. Christianne Gazzana Salbego

Co-orientador: Msc. Mariana Maier Gaelzer

Porto Alegre

Julho de 2014

Resumo

Glioblastomas (GBs) são os tumores mais agressivos envolvendo o Sistema Nervoso Central (SNC), são altamente infiltrativos e de rápida proliferação. O tratamento padrão concilia cirurgia seguida de radio e quimioterapia, mas ainda assim o prognóstico é bastante desanimador: pacientes tem sobrevida média de 15 meses após o diagnóstico. A superexpressão do Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) está bastante relacionada às formas mais malignas de GBs, pois as rotas ativadas por esse receptor estão envolvidas na proliferação e migração celular, além de inibição de apoptose. Em células saudáveis há cerca de 4×10^4 a 1×10^5 moléculas de EGFR, enquanto células tumorais expressam mais de 2×10^6 receptores por célula. O Fator de Crescimento Epidermal (EGF) é a proteína ligante de EGFR, que estimula a dimerização e ativação do receptor, consequentemente estimulando sinalizações de proliferação e inibição da apoptose. Nesse sentido, nosso estudo propôs um protocolo de indução de superexpressão de *EGFR* na presença de EGF exógeno em células de glioma de rato (C6), com a intenção de produzir uma variação da linhagem que mimetizasse com mais veracidade um GB de subtipo clássico, no qual 90% dos casos tem *EGFR* superexpresso. Ainda, tais células foram tratadas com doxazosina, um fármaco análogo a inibidores de EGFR, para avaliação de seu efeito frente à superexpressão de *EGFR*. As células foram expostas às concentrações de 2,5 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL de EGF no meio de cultivo durante 24h e 48h. O número de células viáveis e o estágio no ciclo celular foram avaliados por citometria de fluxo. Não houve diferença significativa no número de células viáveis quando expostas por 24h. No entanto, as amostras tratadas com 10 ng/mL de EGF por 48h apresentaram aumento significativo de proliferação e também se observou aumento na expressão do gene *EGFR* pela análise de qPCR. O tratamento com 180 μ M de doxazosina induziu apoptose nas células superexpressando *EGFR*. Nosso estudo desenvolveu um protocolo de indução de expressão de *EGFR* pela presença de EGF e mostra indícios de que a molécula EGFR está envolvida no mecanismo de ação da doxazosina na indução da apoptose em células de glioma de rato.

*Para a minha Dinda Regina,
com todo o meu amor e saudade.*

Agradecimentos

À orientadora Christianne Salbego, pelo apoio e por ter me recebido em seu laboratório e permitir que esse trabalho fosse realizado.

À co-orientadora Mariana Gaelzer, pela amizade que criamos, pelo suporte e por me incentivar tanto a buscar o que me faz feliz.

Às colegas e amigas Bárbara, por me ensinar e me auxiliar em tudo o que precisei, e Alice, pela ajuda e carinho.

Aos meus amigos, todos, que entenderam as ausências durante o semestre.

À família Patas Dadas, por compartilhar meus desejos e me incentivar a mudar o mundo.

À Rafaela, por ser a irmã mais compreensiva e amorosa que eu poderia ter; e ao Raphael, por todo o apoio, amor e energia que me deste mesmo longe.

À minha grande e amada família, por me apoiar em todas as minhas decisões, sempre.

Sumário

1 Introdução.....	7
1.1 Justificativa	7
1.2 Objetivos.....	7
1.2.1 Objetivo Geral.....	7
1.2.2 Objetivos Específicos.....	7
2 Referencial Teórico.....	9
2.1 Gliomas	9
2.1.1 Glioblastomas	9
2.1.2 Tratamento	10
2.1.3 Subtipos de Glioblastoma	11
2.1.3.1 O Subtipo Clássico	11
2.2 EGFR.....	12
2.3 EGF	14
2.4 Rotas ativadas por EGFR	14
2.4.1 Ras/Raf/MEK/ERK.....	14
2.4.2 PI3K/Akt(PKB)/mTOR.....	16
2.4.3 PLC- γ	16
2.5 Doxazosina	17
3 Métodos.....	19
3.1 Reagentes	19
3.2 Cultivo celular	19
3.3 Curva de EGF.....	19
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.....	19
3.5 Análise por Citometria de Fluxo	20
3.6 Proliferação Celular	20
3.7 Morte Celular	20
3.8 Análise Estatística.....	21
4 Resultados e Discussão	22
5 Considerações Finais	26
6 Referências Bibliográficas.....	27

1 Introdução

1.1 Justificativa

Glioblastomas (GBs) são os tumores mais agressivos do Sistema Nervoso Central e a expectativa de vida de um paciente após o diagnóstico não passa de 15 meses na grande maioria dos casos (Agnihotri *et al.*, 2013; Sengupta *et al.*, 2012). GBs são classificados em quatro subtipos: clássico, mesenquimal, pro-neural e neural (Verhaak *et al.*, 2010). O subtipo clássico é o mais agressivo e se caracteriza por superexpressão do gene do Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (*EGFR*) (Gupta & Salunke, 2012).

Dessa forma, justifica-se a necessidade da busca por métodos que diminuam a progressão tumoral tendo a estrutura química do EGFR como alvo. Diversas terapias farmacológicas tem esse objetivo, destacando-se os anticorpos monoclonais (mAb) anti-EGFR, que se ligam ao receptor no mesmo sítio do seu ligante endógeno e impedem a sua dimerização. Há também as pequenas moléculas inibidoras de tirosina cinase (TKI), que são internalizadas pela célula e conseguem se ligar ao sítio de ligação de moléculas de ATP do EGFR, bloqueando sua ativação dependente de fosforilação.

A fim de mimetizar um GB de subtipo clássico e, portanto, bastante agressivo, este estudo propõe um protocolo de expressão de *EGFR* através da indução de seu ligante EGF em células de glioma de rato C6, adquiridas junto à *American Tissue and Culture Collection* (ATCC), para analisar o efeito de fármacos que tenham o receptor EGFR como alvo. Para tanto, realizou-se uma curva de concentração de EGF e a expressão de *EGFR* foi analisada após o tratamento.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo de indução de expressão de *EGFR* em células de glioma de rato (C6) utilizando diferentes concentrações de EGF no meio de cultivo.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Estabelecer uma curva de concentração em relação à expressão de *EGFR* induzida pela presença de EGF no meio de cultivo.
2. Avaliar a proliferação celular induzida por EGF.
3. Avaliar o efeito do tratamento das células expressando *EGFR* com 180 μ M de mesilato de doxazosina.

2 Referencial Teórico

2.1 Gliomas

Gliomas são tumores sólidos e heterogêneos, bem como são os tumores primários mais comuns. Representam 32% dos tumores de Sistema Nervoso Central (SNC) em adultos e até 80% de todos os tumores malignos que compreendem o cérebro (figura 1) (Goodenberg & Jenkins, 2012; Agnihotri *et al.*, 2013). A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os gliomas em quatro graus de malignidade: gliomas de graus I e II tem pouco potencial proliferativo com células diferenciadas semelhantes a astrócitos e oligodendrócitos; gliomas de graus III e IV apresentam alta atividade mitótica e baixa diferenciação celular e estão associados a um pior prognóstico (Louis *et al.*, 2007). Os gliomas também podem ser classificados em relação à histopatologia – astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas ou ependimoma – e ainda quanto à localização do tumor no cérebro: infra e supratentoriais (Louis *et al.*, 2007; Huse, Holland e Deangelis, 2013).

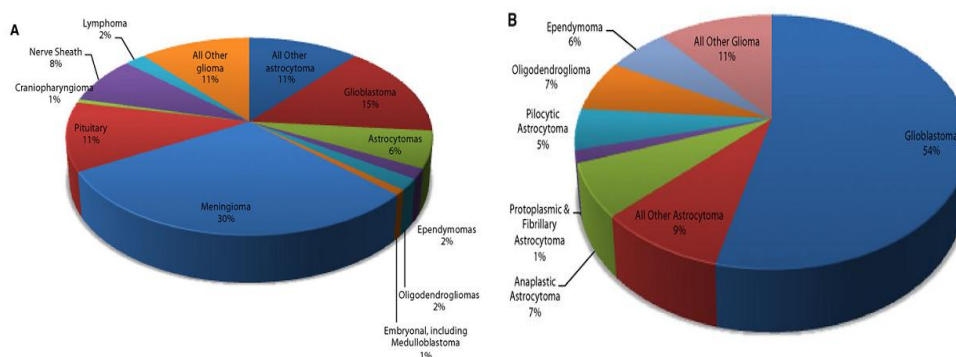


Figura 1: (A) Distribuição dos tumores primários no SNC e (B) distribuição dos gliomas nos Estados Unidos entre 2004 e 2008 (Agnihotri *et al.*, 2013).

2.1.1 Glioblastomas

Glioblastoma (GB) corresponde ao tumor mais agressivo de Sistema Nervoso Central (SNC) (Agnihotri *et al.*, 2013). A avaliação histopatológica classifica GBs como astrocitomas de grau IV, eles representam 55% de todos os tumores astrocíticos e 16% dos tumores primários cerebrais (Figura 1) (Denysenko *et al.*, 2010; Persano *et al.*, 2011; Agnihotri *et al.*, 2013; Ostrom *et al.*, 2013; Goodenberg & Jenkins, 2012).

GBs são altamente infiltrativos e difusos, caracterizados por elevada celularidade, uma variedade de atipias nucleares e intensa atividade mitótica. O crescimento infiltrativo impede a ressecção cirúrgica definitiva e sua agressividade levam a um prognóstico ruim (Huse, Holland e Deangelis, 2013).

2.1.2 Tratamento

A terapia estabelecida na clínica consiste em ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia e quimioterapia adjuvantes (Stupp et al, 2005; Li et al, 2014). No entanto, a expectativa de vida de pacientes após o diagnóstico não passa de 15 meses, em média, com recidiva do tumor e invasão em sete meses após início do tratamento radioterápico (Stupp *et al.*, 2005; Sengupta et al, 2012). Em apenas 5% dos casos, pacientes diagnosticados com GB sobrevivem cerca de 5 anos (Goodenberg & Jenkins, 2012).

A massa tumoral muitas vezes pode invadir áreas cerebrais funcionais, impossibilitando a ressecção cirúrgica sem que sejam afetadas as atividades motoras e/ou os processos cognitivos, comprometendo a qualidade de vida do paciente (Sanai e Berger, 2008). Outro problema relacionado à ressecção cirúrgica é que GBs são tumores altamente infiltrativos e multifocais, dessa forma, nem todas as células tumorais são removidas, e as células restantes são responsáveis pela recorrência do tumor.

A resistência a quimioterápicos é outro fator que dificulta o tratamento pós-operatório. GBs apresentam diversas anormalidades genéticas e esta heterogeneidade é um desafio terapêutico, porque as células podem responder de forma diferente à terapia. A desregulação de enzimas celulares e de proteínas transportadoras de membranas, aberrações genômicas e alterações na susceptibilidade a apoptose são responsáveis pela alta incidência de quimio-resistência nas células tumorais (Bredel *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012).

Nesse sentido, estudos indicam que a avaliação histopatológica é limitada ao delineamento do tratamento, pois não é precisa em relação à heterogeneidade celular. Vitucci e colaboradores (2011) relatam diversas análises do perfil de expressão gênica (GEP) de glioblastomas e que indicam a GEP como uma fonte de classificação mais confiável, especialmente no caso

de gliomas morfológicamente ambíguos. No entanto, apesar de já haver a aplicação clínica dessa análise genômica em casos de câncer de mama, a aplicação na neurooncologia ainda não ocorre (Vitucci et al., 2011).

2.1.3 Subtipos de Glioblastoma

Devido à diversidade gênica das células que constituem os GBs, estudos de GEP tem sugerido uma classificação baseada em características moleculares desses tumores (Verhaak et al, 2010). Eles tem demonstrado que assinaturas transcricionais efetivamente podem distinguir gliomas de baixo grau e GB. Além disso, identificam genes que tem seus níveis de expressão correlacionados ao prognóstico (revisado por Huse, Holland & DeAngelis, 2010). Quatro subtipos de GB foram definidos: clássico, mesenquimal, pro-neural e neural (figura 2).

Clássico	Mesenquimal	Pro-neural	Neural
<ul style="list-style-type: none"> • Amplificação cromossomo 7 (EGFR) • Ausência cromossomo 10 • TP53 não mutada 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa expressão de NF1 • PTEN mutada • Alta expressão de YKL40, CD44, TRADD 	<ul style="list-style-type: none"> • TP53 mutada • Alta expressão de PDGFRA, SOX, DLL3 	<ul style="list-style-type: none"> • Marcadores neurais NEFL, GABRA1 • Algumas células normais

Figura 2: Subtipos de Glioblastoma com base em assinaturas moleculares (adaptado de Bartek et al, 2012).

2.1.3.1 O Subtipo Clássico

O subtipo clássico se caracteriza por amplificação do cromossomo 7 e consequente superexpressão do gene *EGFR* (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal), que afeta a proliferação e o crescimento celular, somada à perda do cromossomo 10 (figura 2) (Verhaak et al, 2010; Bartek et al, 2012). *EGFR* é o gene mais frequentemente amplificado e superexpresso em GB e afeta cerca de 40% desses tumores (Gupta & Salunke, 2012). Amplificação de *EGFR* é um indicativo de gliomas de alto grau (Gupta & Salunke, 2012), embora sua aplicação em prognósticos ainda não esteja clara (Louis et al, 2007).

Ainda, esse subtipo apresenta mutações que resultam no variante EGFRvIII (o receptor está constitutivamente ativo nesse caso), deleção do gene *CDKN2A* (transcreve a p16, proteína supressora tumoral que atua sob o ciclo celular), e ausência de mutações na TP53 (figura 2) (Vitucci et al, 2011).

2.2 EGFR

EGFR é um receptor transmembrana, membro da família ErbB de receptores tirosina cinase que compreende três receptores adicionais, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 (Normanno et al, 2006). A fosforilação das porções intracelulares desses receptores ativa rotas de sinalização como Ras-ERK e PI3K-Akt, entre outras (Tebbutt et al, 2013). O EGFR exerce uma função importante na regulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Os ligantes responsáveis pela sua ativação incluem: EGF (Fator de Crescimento Epidermal), TGF- α (Fator de Crescimento Transformador alfa), anfiregulina, betacelulina, dentre outros. (Yewale et al, 2013).

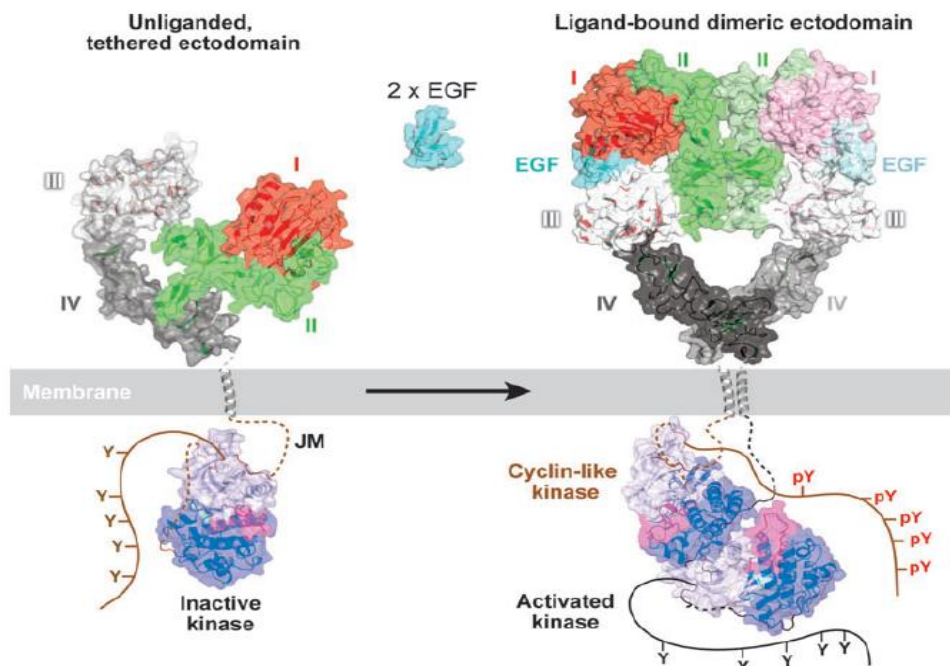


Figura 3: Conformação de EGFR e ativação dependente de ligante. A porção extracelular é formada por quatro domínios. Na ausência do ligante (EGF), o receptor está em uma conformação autoinibitória com o braço de dimerização do domínio II “escondido” sob o domínio IV. A ligação de EGF nos domínios I e III induz o rearranjo da molécula, que apresenta uma conformação estável. A exposição do braço de dimerização é a interface necessária à ligação com outro monômero do receptor para sua ativação (Ferguson, 2008).

A porção extracelular de EGFR é composta pelos domínios I, II, III e IV (também denominados L1, CR1, L2 e CR2, respectivamente), e a interação do ligante com os domínios I e III do receptor faz com que ele se estabilize em uma conformação estendida capaz de formar dímeros (figura 3) (Jorissen et al, 2003). Dados da literatura descrevem a formação de homo ou heterodímeros, bem como relata que diferentes ligantes formam dímeros que se autofosforilam em locais distintos (Yewale et al, 2013).

Enquanto inativo, o EGFR ocorre na membrana plasmática como um monômero. A ligação de uma molécula EGF ou outro ligante compatível (TGF- α , anfiregulina, betacelulina) em um monômero do receptor induz uma mudança de conformação: a exposição do braço de dimerização da porção II, que permite a ligação de dois monômeros de EGFR. A dimerização ativa a atividade das cinases na porção intracelular, e leva à formação de invaginações cobertas por clatrina na membrana. Essas invaginações formam vesículas endocíticas que se fusionam com endossomos iniciais. Moléculas de EGFR que estão presentes nesses compartimentos retornam à membrana plasmática (recicladas) ou são destinadas à degradação (Yewale et al, 2013). Na ausência de ligante, EGFR está internalizado e possui meia-vida de 30 minutos sendo rapidamente reciclado e devolvido à membrana plasmática. A meia-vida metabólica de EGFR em linhagens celulares tumorais é de 20h, isso significa que o mesmo receptor irá ciclar na via endocítica diversas vezes durante esse tempo. O tráfico de EGFR pode afetar a farmacocinética de drogas derivadas de anticorpos que se ligarão ao receptor e também serão internalizadas (Yewale et al, 2013).

Em células saudáveis há cerca de 4×10^4 a 1×10^5 moléculas de EGFR, enquanto células tumorais expressam mais de 2×10^6 receptores por célula (Herbst et al, 2002; Yewale, 2013). Por essa razão, diversas alternativas terapêuticas para câncer tem sido desenvolvidas visando moléculas EGFR como alvo. Os agentes mais promissores são os anticorpos monoclonais (mAb) e as moléculas inibidoras de tirosina cinase (TKI), que apresentam mecanismos de ação e especificidade distintos para o mesmo alvo. mAbs se ligam à porção extracelular do receptor e competem com as moléculas ligantes, impedindo a ativação das cascatas de sinalização (Garrett et al, 2002; Ogiso et

al, 2002; Yewale, 2013); TKIs inibem a autofosforilação da porção citoplasmática de EGFR ao competirem com ATP endógeno pelo domínio catalítico da molécula (Yewale et al., 2013).

2.3 EGF

O Fator de Crescimento Epidermal (EGF) é um polipeptídeo composto por 53 aminoácidos que estimula a proliferação celular em diversos tecidos, sendo inicialmente isolado de glândulas submaxilares de camundongos adultos (Ogiso et al, 2002). A família EGF também compreende TGF- α , HB-EGF, anfiregulina, betacelulina, Dentre outras, porque compartilham a mesma estrutura primária: um ou mais motivos EGF, ou seja, uma sequência de 35-40 aminoácidos separados por seis resíduos conservados de cisteína seguindo o seguinte padrão: CX7CX3–5CX10–12CXCX5GXRC (C, cisteína; G, glicina; R, arginina; X, outro aminoácido) (Harris et al, 2003; Zeng & Harris, 2014). Os resíduos de cisteína pareiam-se e formam três pontes dissulfeto essenciais à manutenção da atividade biológica da molécula (figura 4) (Zeng & Harris, 2014).

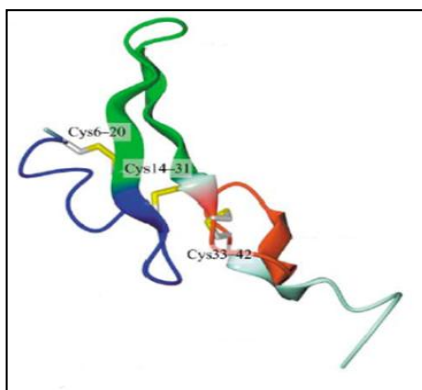


Figura 4: Estrutura da molécula de EGF. As três pontes dissulfeto aparecem em amarelo (Ogiso et al, 2002).

Elevada expressão de EGF está relacionada com progressão tumoral e metástase através de diversos mecanismos, destacando-se (a) estímulo de metaloproteinasas de matriz (MMP1 e MMP9) e (b) desregulação da atividade autofágica (Zeng & Harris, 2014).

2.4 Rotas ativadas por EGFR

2.4.1 Ras/Raf/MEK/ERK

A rota de sinalização que envolve as proteínas Ras, Raf, MEK (proteína cinase ativada por mitógeno) e ERK (cinase regulada por sinal extracelular) é objeto de intenso estudo, pois ela ativa fatores de transcrição que regulam expressão de genes antiapoptóticos e envolvidos em proliferação celular (Chang et al, 2003). Essa rota está diretamente relacionada ao EGFR, pois a ativação do receptor é o primeiro sinal necessário à sua regulação (figura 5).

Quando EGF se liga ao EGFR e esse sofre dimerização e autofosforilação, a proteína Grb2 pode se ligar ao receptor via seu domínio SH2. Ligada ao EGFR, Grb2 recruta a proteína SOS. O complexo Grb2-SOS está associado ao EGFR, portanto próximo da membrana plasmática; dessa forma, a proteína SOS pode induzir a ativação da Ras, que reside nesse local, pela troca de GDP por GTP (Jorissen *et al.*, 2003).

A Ras pertence à família de proteínas G, portanto inativa quando ligada à GDP e ativa quando ligada à GTP. A proteína SOS se torna ativa após a dimerização e autofosforilação de domínios tirosina cinase no EGFR (processos que permitem a ligação do complexo Grb2-SOS ao receptor), assim ela induz a troca de nucleotídeo em Ras, ativando-a. Ras recruta a proteína Raf, uma cinase serina/treonina que se dimeriza e sofre fosforilação em diversos domínios (Chang et al, 2003; Yamamoto et al, 1999; Weber et al, 2001). Raf ativa pode fosforilar a MEK, ativando-a. A MEK então fosforila e ativa a ERK, que irá regular a expressão de genes via ativação ou inibição de fatores de transcrição.

Alguns dos fatores de transcrição ativados por ERK são c-Myc e c-Jun, além de CREB, que é indiretamente ativado por ERK (Chang et al, 2003). c-Myc é o produto do gene *myc* e é um protooncogene com bastante influência na tumorigênese, pois atua na proliferação e há relatos de que sua desregulação altera os *checkpoints* do ciclo celular (Dominguez-Sola et al, 2007). c-Jun é uma proteína que forma uma heterodímero com a proteína Fos, formando o complexo AP-1. AP-1 é um fator de transcrição que exerce função crítica na regulação da sobrevivência de uma célula (Shaulian & Karin, 2001). CREB pertence a uma família de fatores de transcrição composta por proteínas nucleares que formam um zíper a redor do DNA, regulando a transcrição de

diversos genes. Muitos desses genes estão relacionados à progressão no ciclo celular como as ciclinas A1, A2, D1 e D2 (Mantamadiotis et al, 2012).

2.4.2 PI3K/Akt(PKB)/mTOR

Quando EGFR se dimeriza, ele recruta diversas proteínas para a região próxima à membrana. Dentre essas proteínas está a PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase), cuja ação é fosforilar lipídios de membrana (especificamente fosfatidilinositol) gerando moléculas como o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) que interagem com proteínas efetoras e transduzem o sinal da membrana para o citoplasma (Fumarola et al., 2014). PIP3 fosforila proteínas que possuem domínio plectrina (PH), sendo a mais notável a Akt (ou proteína cinase B, PKB), que necessita de uma segunda fosforilação para ser ativada, a qual é mediada pelo mTORC2 (figura 5).

Akt em seu estado ativo fosforila e inibe proteínas relacionadas à apoptose – como BAD (Promotor de Morte Associado à Bcl-2) – e estimula a progressão no ciclo celular. Ainda, Akt promove a ativação (de forma indireta) de mTORC1, um dos principais reguladores do metabolismo e crescimento celular. mTORC1 tem função na inibição da autofagia (via fosforilação de seus substratos ULK1 e ATG13), bem como na regulação da síntese de proteínas e lipídios (via ativação de diversas proteínas como p70S6K) (Takei et al, 2014).

2.4.3 PLC- γ

O metabolismo de fosfolipídios é bastante regulado pela ativação de EGFR e por isso está envolvido em diversos processos celulares. A atividade desses lipídios é mediada por enzimas como a Fosfolipase-C gama (PLC- γ), que tem no EGFR ativado seu primeiro estímulo para sinalização. PLC- γ se liga diretamente ao dímero de EGFR, é fosforilada por esse receptor e se torna ativa. Ativação de PLCs está envolvida na tumorigênese e metástase via migração e reorganização de citoesqueleto e diversos tumores demonstram ter expressão alterada desse grupo de enzimas (Yang et al, 2013) (figura 5).

Na forma ativa, PLC- γ é capaz de hidrolisar o lipídio de membrana fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) e gerar os segundos mensageiros 1,2-

diacilglicerol (DAG) e inositol-1,3,5-trifosfato (IP3). IP3 atua na liberação do Ca^{2+} intracelular e afeta a atividade de diversas enzimas cálcio-dependentes. DAG é um cofator na ativação da proteína cinase C (PKC) e, conseqüentemente, das rotas de sinalização ativadas por PKC (Jorissen et al, 2003). Devido a esses eventos, PLC- γ atua nos processos de proliferação, migração, sobrevivência e morte celular (Yang et al, 2012).

A atividade de PLC- γ é regulada positivamente pela interação de seu domínio PH com PIP3 (Lattanzio et al, 2013). Quando essa interação ocorre, PLC- γ é recrutado para a região da membrana plasmática e exerce sua atividade hidrolítica em PIP2 (Park et al, 2012). 4

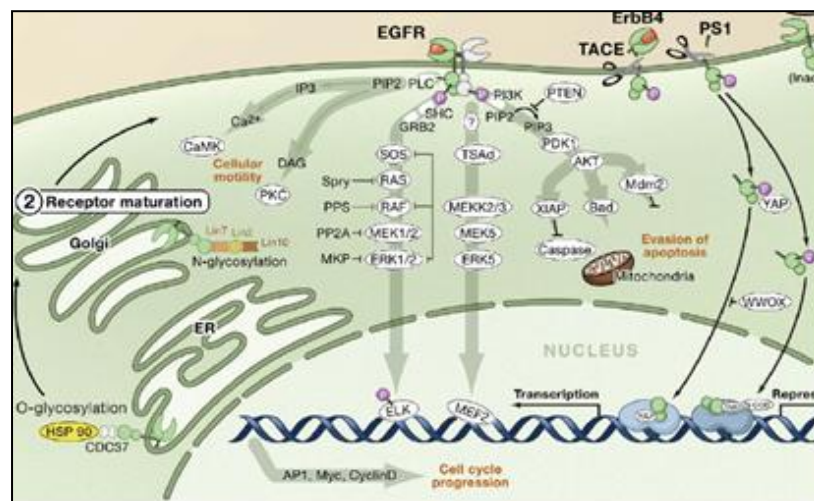


Figura 5: Rotas ativadas por EGFR. Homo ou heterodímeros do receptor se autofosforilam e recrutam diversas enzimas (PLC, por exemplo) e proteínas adaptadoras (como Grb2 e SOS). A ativação dessas rotas resulta em estímulos à proliferação e também em inibição de apoptose (adaptado de Yarden & Shilo, 2007).

2.5 Doxazosina

A doxazosina é um derivado quinazolinico que compreende a classe terapêutica dos alfa-bloqueadores adrenérgicos (Hansson et al, 1998). Ela é utilizada na clínica como Mesilato de doxazosina (Cardura®) para o tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e hiperplasia benigna de próstata. Estudos mostram que a doxazosina e seus derivados quinazolinicos são potentes (como potentes) indutores de apoptose na em (próstata de pacientes com) tumores benignos prostáticos sem afetar sua capacidade

proliferativa (Kyprianou et al, 1998; Chon et al, 1999). Além disso, evidências suportam que esse fármaco suprime o crescimento de células tumorais por um mecanismo independente ao relacionado com o adrenoceptor alfa-1 (Kyprianou & Benning, 2000). Entretanto, até hoje não existem estudos conclusivos sobre o mecanismo de ação antineoplásico da doxazosina.

Através dos resultados obtidos na análise da estrutura química da doxazosina e sua relação com atividade biológica, nosso grupo observou que o fármaco possui padrão molecular similar a agentes quimioterápicos utilizados na clínica, como os inibidores de tirosina cinase Erlotinib® e Lapatinib® (figura 6) (Gaelzer, 2013). Tais agentes tem os receptores da família ErbB como alvo.

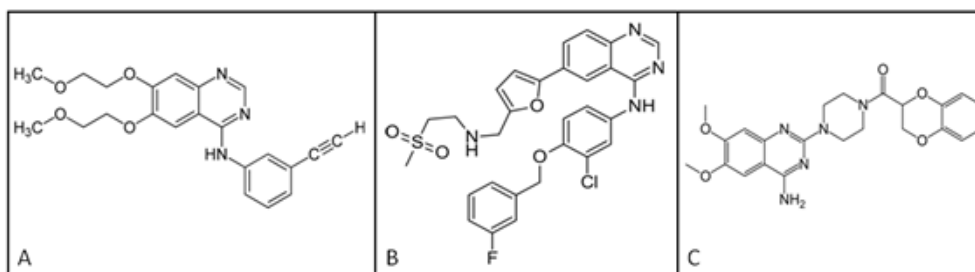


Figura 6: Estrutura química de (A) Erlotinib, (B) Lapatinib e (C) Doxazosina.

3 Métodos

3.1 Reagentes

Meio de cultivo celular *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) e soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Gibco® (Grand Island, NY, USA). 5-Bromodeoxiuridina (5-BrdU) e EGF recombinante humano foram obtidos da empresa Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). Iodeto de propídio e Alexa Fluor® 488 Anexina V foram adquiridos da empresa Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

3.2 Cultivo celular

A Linhagem celular de glioma de rato (C6) foi obtida junto à ATCC (Rockville, MD, USA). As células foram mantidas e expandidas em DMEM (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA) suplementado com 5% (v/v) soro fetal bovino (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA), contendo 2,5 mg/mL de Fungizona® e 100 U/L de gentamicina (Shering do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). As células foram mantidas a uma temperatura de 37°C e com umidade relativa de 5% CO₂ atmosférico.

3.3 Curva de EGF

Células em 70-80% de confluência foram semeadas em placas de 6 poços com densidade de 50.000 células por poço. As concentrações utilizadas de EGF foram: 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL com tempos de incubação de 24 e 48hs.. Tais valores foram baseados no estudo de Schwabedissen e colaboradores (2006), que observaram aumento na expressão da proteína de resistência do câncer de mama (BCRP) em células estimuladas com EGF exógeno.

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A expressão do gene *EGFR* foi analisada pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Foi realizada extração de RNA total com o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as especificações do fabricante. A concentração de RNA foi quantificada por

absorbância UV no aparelho BioPhotometer Plus (Eppendorf, USA). A transcrição reversa foi realizada com o kit SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA), a partir de 300 ng de RNA total em cada amostra. O cDNA sintetizado foi diluído 10 vezes para a qPCR com os *primers* de *EGFR* e do gene endógeno β 2-Microglobulina (β 2M). Os *primers* de *EGFR* utilizados foram: 5'-CCTGGAAGAGACCTGCATTATC-3' (senso) e 5'-CAGAGCTGTCAAACCCACTAC-3' (antissenso) e foram adquiridos junto à Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Os *primers* de β 2M utilizados foram: 5'-TCCTGGCTCACACTGAATTC-3' (senso) e 5'-CTTTGTGGATAAATTGTATAGCA-3' (antissenso). O aparelho de qPCR utilizado foi o StepOne™ System (Applied Biotechnologies, Foster City, CA, USA). Todas as análises foram realizadas em triplicata e as quantidades relativas de *EGFR* foram normalizadas em relação à expressão de β 2M de acordo com o método $\Delta\Delta$ Ct.

3.5 Análise por Citometria de Fluxo

Citometria de Fluxo foi utilizada para contar o número de células e avaliar o estágio no ciclo celular das amostras tratadas com EGF. Utilizou-se o aparelho FACSCalibur (Becton Dickinson) e as análises foram feitas por meio do programa FCS Express 4 (De Novo Software™). Cada análise incluiu ao menos 10.000 eventos.

3.6 Proliferação Celular

Para analisar a proliferação celular, adicionou-se ao meio de cultivo o marcador fluorescente e análogo de timidina 5-BrdU. As células foram observadas em microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse TE300) e as imagens foram capturadas utilizando uma câmera CCD (DXM1200C Nikon Instruments Inc., USA).

3.7 Morte Celular

A fim de avaliar se os tratamentos induziram a morte celular, foi utilizado o kit AlexaFluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis (Molecular Probes®, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as especificações do fabricante. As células

foram observadas em microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse TE300) e as imagens foram capturadas utilizando uma câmera CCD (DXM1200C Nikon Instruments Inc., USA).

3.8 Análise Estatística

Todos os dados são expressos como média±EP. Todos os resultados são representativos de ao menos dois experimentos independentes. Para a análise da expressão de *EGFR* por qPCR foi utilizado teste t. A ANOVA de uma via foi utilizada para análise da contagem de células pelo citômetro de fluxo, seguida pelo teste de Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4 Resultados e Discussão

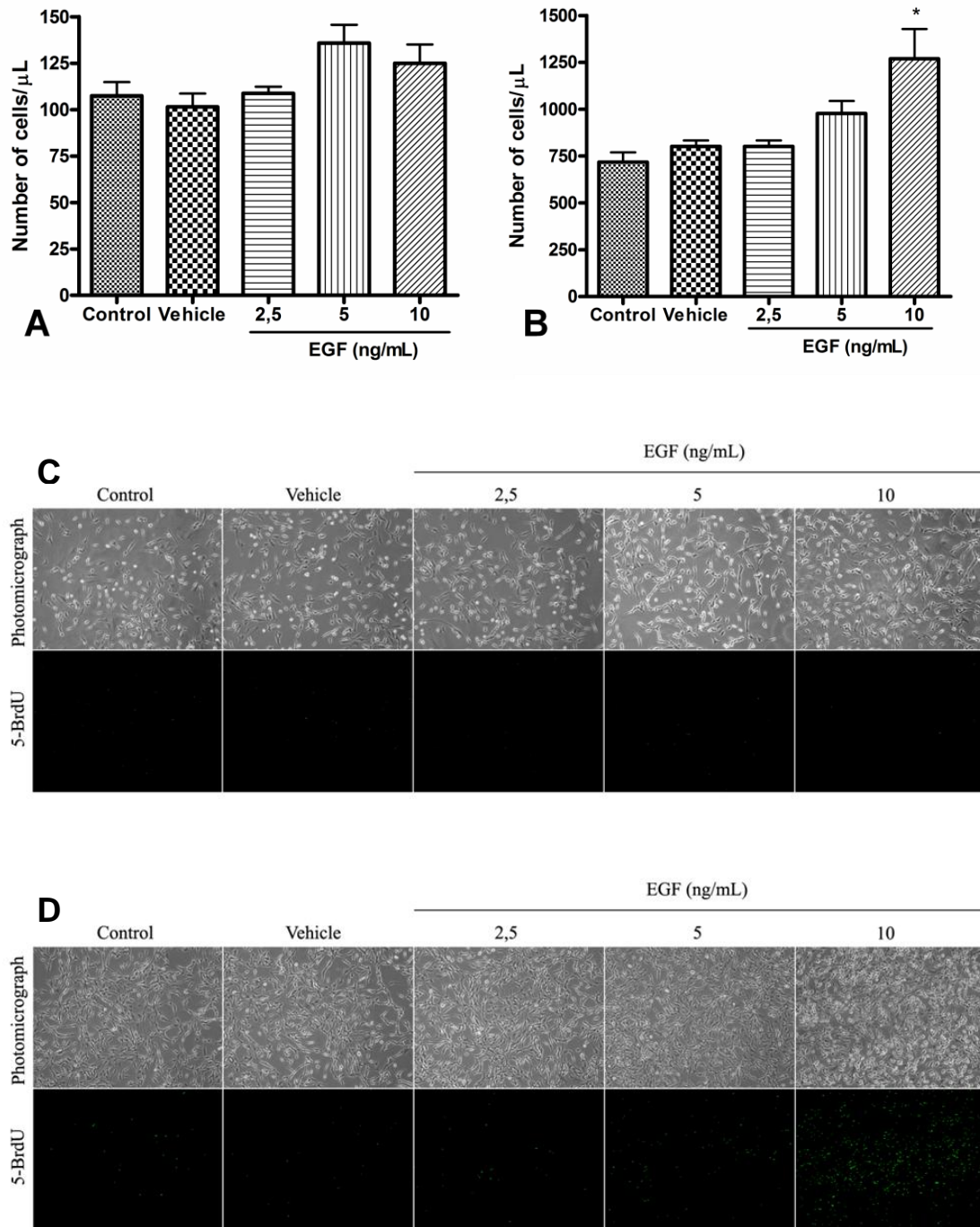


Figura 7: Número de células viáveis após 24h (A) e 48h (B) de tratamento. Em 48h o grupo tratado com 10 ng/mL de EGF demonstrou aumento significativo em relação ao controle (ANOVA de uma via, seguida de Teste de Tukey, * $P < 0,05$). Incorporação de 5-BrdU em células tratadas por 24h (C) e 48h (D) (aumento 100x).

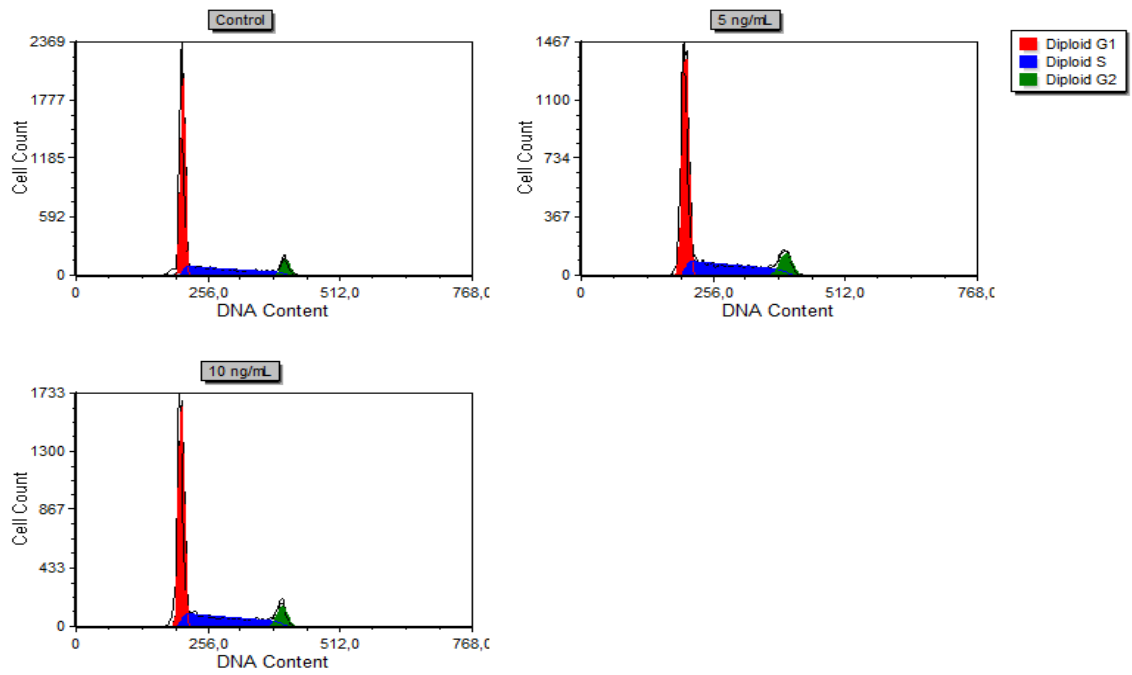


Figura 8: Análise de ciclo celular após 48 horas de tratamento para os grupos controle, 5 ng/mL e 10 ng/mL de EGF. Células tratadas com EGF apresentaram progressão da fase G1 para as fases S e G2.

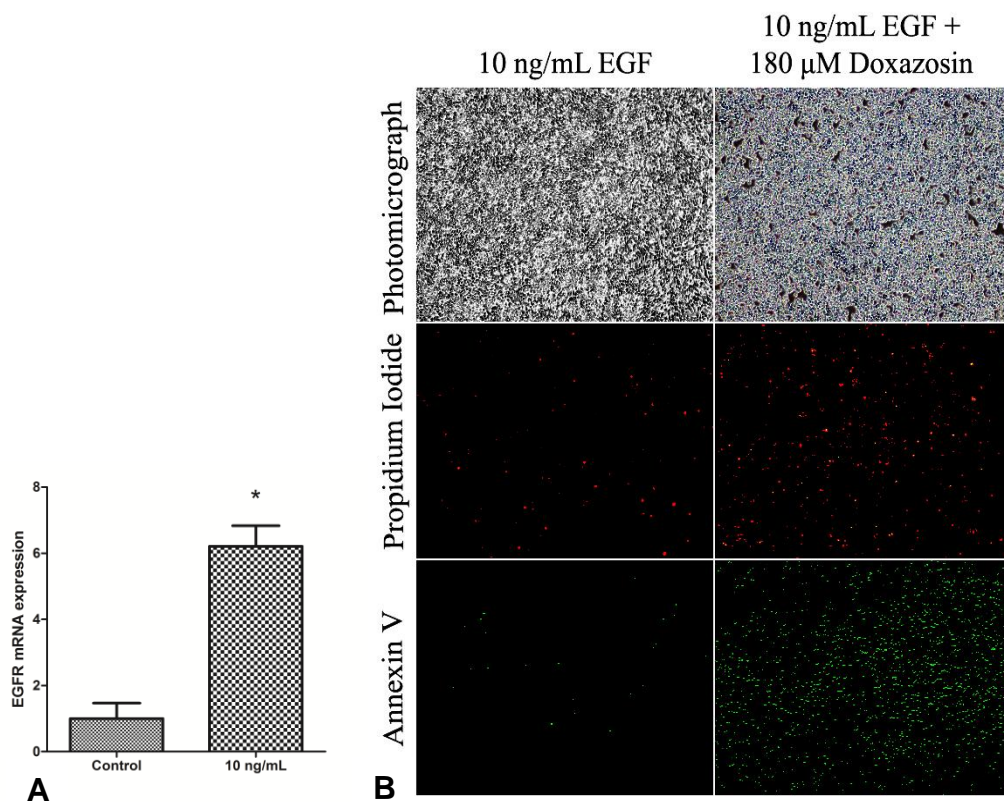


Figura 9: (A) Expressão de *EGFR* em células do grupo controle e tratadas com 10 ng/mL de EGF durante 48 horas (Teste t, * $P < 0,01$). (B) Células expressando *EGFR* antes e após adição

de 180 μ M de doxazosina marcadas com iodeto de propídeo e anexina V (aumento 100x, filtros rodamina e FITC).

As células tratadas com 2,5 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL de EGF durante 24 horas não demonstraram diferença significativa quanto ao número de células em relação ao controle ($P>0,05$) (figura 7A) e não foi observado aumento da incorporação de 5-BrdU nesse período (figura 7C). Após 48 horas, o tratamento com 10 ng/mL de EGF apresentou diferença significativa em relação ao controle ($P<0,05$) quanto à contagem de células (figura 7B), enquanto os outros grupos tratados não diferiram. Ainda, uma grande quantidade de 5-BrdU foi incorporada pelas células nesse mesmo período. Houve maior incorporação do marcador principalmente naquelas tratadas com 10 ng/mL de EGF (figura 7D).

O estímulo causado por EGF parece gerar uma resposta lenta e gradual por parte da célula, pois em 24 horas de tratamento não se observou incorporação de 5-BrdU (figura 7C). No entanto, não significa que não houve aumento da expressão de proteínas relacionadas a vias de proliferação. Um estudo relatado por Schwabedissen e colaboradores (2006) demonstrou que, em células fibroblásticas (MCF-7), o EGF induziu o aumento na expressão de alguns genes e de proteínas relacionadas a essas vias em 12 e 24 horas. Essa indução foi observada nas mesmas concentrações de EGF utilizadas no presente estudo. Portanto, é possível que apesar do número de células não ter diferido significativamente, as células já iniciaram uma resposta ao estímulo causado por EGF, de forma a ativar rotas proliferativas.

Na análise do ciclo celular (figura 8) é possível observar que os tratamentos de 5 ng/mL e 10 ng/mL de EGF por 48 horas estimularam as células a passarem da fase G1 para as fases S e G2. Esses resultados indicam que o tratamento com EGF na concentração de 10 ng/mL por 48h aumentou a proliferação das células de glioma de rato (C6).

Procedeu-se à análise da expressão do gene *EGFR* em células tratadas com 10 ng/mL de EGF durante 48 horas, pois foi observado efeito desse tratamento na proliferação celular. A análise de qPCR, demonstrou aumento da expressão de *EGFR* (figura 9A) na concentração de 10 ng/mL de EGF

($P < 0,01$). Diante disso, observamos que o aumento da proliferação observada (figura 7B) pode estar relacionado a uma maior quantidade de EGFR sendo expresso nessas células.

Wang e colaboradores (2010) mencionaram diversos estudos que demonstram a internalização de EGFR imediatamente após a ligação de EGF ao receptor. A endocitose é um processo fundamental que controla a intensidade e a duração do sinal enviado quando o receptor é ativado. Vesículas contendo EGFR ativo se fusionam com endossomos iniciais e, nesses compartimentos, o destino dos receptores é definido: serão reciclados de volta à superfície ou enviados para degradação lisossomal (Wang et al., 2010). É possível que em 24 horas o EGF tenha induzido a internalização dos receptores sem que eles fossem degradados sendo reciclados de volta à membrana. Dessa forma, não há necessidade de um número maior de receptores ser expresso. Quando as células são tratadas por 48 horas a expressão em níveis fisiológicos do EGFR pode não ser suficiente para responder ao estímulo de EGF no meio, fazendo-se necessário o aumento da expressão do receptor (figura 9A).

Com o objetivo de estudar se o EGFR é a molécula alvo da Doxazosina, as células C6 com expressão de EGFR aumentada (C6-EGFR+) foram expostas a 180 μ M de Doxazosina. Essa concentração foi escolhida com base em estudo anterior do nosso grupo, que demonstrou o efeito antitumoral da Doxazosina na linhagem C6 normal (Gaelzer, 2013). Nesse mesmo estudo foi observada a presença de 30-40% de células resistentes ao fármaco. Após 48 horas de tratamento com 180 μ M de Doxazosina nas C6-EGFR+ não foram observadas células viáveis (figura 9B). Ainda, a marcação com Anexina V indica que a morte causada por doxazosina é majoritariamente apoptótica (figura 9B).

Nosso estudo foi capaz de induzir o aumento na expressão de *EGFR* em células de glioma de rato na presença de 10 ng/mL de EGF durante 48 horas (figura 10). Observamos aumento na proliferação celular após o tratamento, que pode estar relacionado à maior expressão do receptor nas células e consequente ativação de vias proliferativas. Acredita-se que o EGFR está

relacionado à ação da Doxazosina, mas não se excluem possibilidades de que outros receptores ou proteínas associadas às vias de proliferação também desempenhem papel no mecanismo de ação do fármaco.

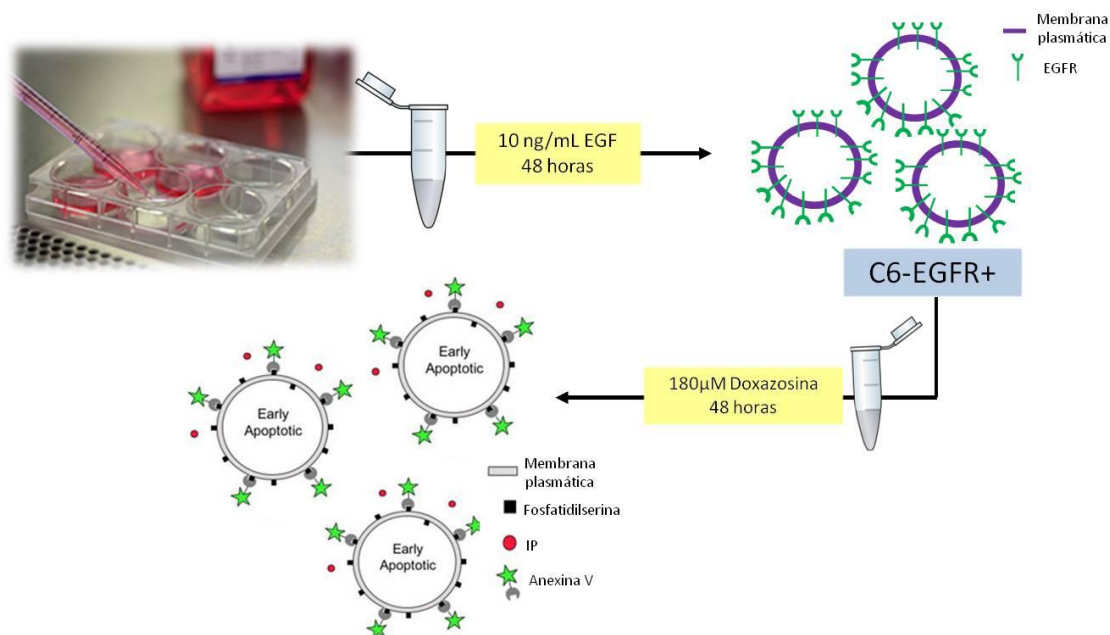


Figura 10: Esquema representativo dos resultados obtidos. O tratamento com 10 ng/mL de EGF em células C6 induziu maior expressão de EGFR (C6-EGFR+) e o tratamento com 180 μM de Doxazosina induziu apoptose nas C6-EGFR+.

5 Considerações Finais

Por fim, nosso grupo irá continuar analisando a expressão de EGFR frente ao tratamento com EGF e após a retirada do estímulo, a fim de determinar qual a duração da resposta obtida pelo fator de crescimento. Ainda, ensaios de imunoblotting serão realizados para avaliar se a expressão aumentada do receptor se correlaciona com a sua síntese. Seguiremos, também, estudando o mecanismo de ação da Doxazosina em células de glioma de rato para entender melhor a participação do EGFR no processo de apoptose induzido pelo fármaco.

6 Referências Bibliográficas

AGNIHOTRI, S. et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 61, n. 1, p. 25-41, Feb 2013. ISSN 1661-4917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23224339> >.

BARTEK, J. et al. Key concepts in glioblastoma therapy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 83, n. 7, p. 753-60, Jul 2012. ISSN 1468-330X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22396442> >.

BREDEL, M. et al. NFKBIA deletion in glioblastomas. **N Engl J Med**, v. 364, n. 7, p. 627-37, Feb 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21175304> >.

CHANG, F. et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. **Leukemia**, v. 17, n. 7, p. 1263-93, Jul 2003. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12835716> >.

CHON, J. K. et al. Alpha 1-adrenoceptor antagonists terazosin and doxazosin induce prostate apoptosis without affecting cell proliferation in patients with benign prostatic hyperplasia. **J Urol**, v. 161, n. 6, p. 2002-8, Jun 1999. ISSN 0022-5347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10332490> >.

DENYSENKO, T. et al. Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. **Cell Biochem Funct**, v. 28, n. 5, p. 343-51, Jul 2010. ISSN 1099-0844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20535838> >.

DOMINGUEZ-SOLA, D. et al. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 445-51, Jul 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597761> >.

FUMAROLA, C. et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. **Biochem Pharmacol**, May 2014. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24863259> >.

GAELZER, M. M. Investigação do efeito da Doxazosina sobre linhagem de glioma humano (U138-MG) e de rato (C6). 2013. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

GARRETT, T. P. et al. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 763-73, Sep 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297049> >.

GOODENBERGER, M. L.; JENKINS, R. B. Genetics of adult glioma. **Cancer Genet**, v. 205, n. 12, p. 613-21, Dec 2012. ISSN 2210-7762. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23238284>>.

GUPTA, K.; SALUNKE, P. Molecular markers of glioma: an update on recent progress and perspectives. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 138, n. 12, p. 1971-81, Dec 2012. ISSN 1432-1335. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052697>>.

HANSSON, L.; HIMMELMANN, A. Carvedilol in the treatment of hypertension--a review of the clinical data base. **Scand Cardiovasc J Suppl**, v. 47, p. 67-80, 1998. ISSN 1401-7458. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9540136>>.

HARRIS, R. C.; CHUNG, E.; COFFEY, R. J. EGF receptor ligands. **Exp Cell Res**, v. 284, n. 1, p. 2-13, Mar 2003. ISSN 0014-4827. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648462>>.

HUSE, J. T.; HOLLAND, E.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma: molecular analysis and clinical implications. **Annu Rev Med**, v. 64, p. 59-70, 2013. ISSN 1545-326X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23043492>>.

JACKSON, R. J. et al. Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas. **Neuro Oncol**, v. 3, n. 3, p. 193-200, Jul 2001. ISSN 1522-8517. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11465400>>.

JORISSEN, R. N. et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. **Exp Cell Res**, v. 284, n. 1, p. 31-53, Mar 2003. ISSN 0014-4827. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648464>>.

KOSAKA, T. et al. Mechanisms of resistance to EGFR TKIs and development of a new generation of drugs in non-small-cell lung cancer. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 165214, 2011. ISSN 1110-7251. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21687596>>.

KYPRIANOU, N.; BENNING, C. M. Suppression of human prostate cancer cell growth by alpha1-adrenoceptor antagonists doxazosin and terazosin via induction of apoptosis. **Cancer Res**, v. 60, n. 16, p. 4550-5, Aug 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969806>>.

KYPRIANOU, N. et al. Induction of prostate apoptosis by doxazosin in benign prostatic hyperplasia. **J Urol**, v. 159, n. 6, p. 1810-5, Jun 1998. ISSN 0022-5347. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9598465>>.

LATTANZIO, R.; PIANTELLI, M.; FALASCA, M. Role of phospholipase C in cell invasion and metastasis. **Adv Biol Regul**, v. 53, n. 3, p. 309-18, Sep 2013.

ISSN 2212-4934. Disponível em:

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23925006> >.

LI, P. et al. Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. **Int J Med Sci**, v. 10, n. 4, p. 399-407, 2013. ISSN 1449-1907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471193> >.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol**, v. 114, n. 2, p. 97-109, Aug 2007. ISSN 0001-6322. Disponível em:

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618441> >.

MANTAMADIOTIS, T.; PAPALEXIS, N.; DWORKIN, S. CREB signalling in neural stem/progenitor cells: recent developments and the implications for brain tumour biology. **Bioessays**, v. 34, n. 4, p. 293-300, Apr 2012. ISSN 1521-1878. Disponível em:

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22331586> >.

MEYER ZU SCHWABEDISSEN, H. E. et al. Epidermal growth factor-mediated activation of the map kinase cascade results in altered expression and function of ABCG2 (BCRP). **Drug Metab Dispos**, v. 34, n. 4, p. 524-33, Apr 2006. ISSN 0090-9556. Disponível em:

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415123> >.

NORMANNO, N. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, n. 1, p. 2-16, Jan 2006. ISSN 0378-1119. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16377102> >.

OGISO, H. et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 775-87, Sep 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em:

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297050> >.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. **Neuro Oncol**, v. 15 Suppl 2, p. ii1-56, Nov 2013. ISSN 1523-5866. Disponível em:

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24137015> >.

PARK, J. B. et al. Phospholipase signalling networks in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 11, p. 782-92, Nov 2012. ISSN 1474-1768. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076158> >.

PERSANO, L. et al. The three-layer concentric model of glioblastoma: cancer stem cells, microenvironmental regulation, and therapeutic implications. **ScientificWorldJournal**, v. 11, p. 1829-41, 2011. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22125441> >.

SANAI, N.; BERGER, M. S. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. **Neurosurgery**, v. 62, n. 4, p. 753-64; discussion 264-6, Apr

2008. ISSN 1524-4040. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18496181> >.
- SENGUPTA, S. et al. Impact of temozolomide on immune response during malignant glioma chemotherapy. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 831090, 2012. ISSN 1740-2530. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23133490> >.
- SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nat Cell Biol**, v. 4, n. 5, p. E131-6, May 2002. ISSN 1465-7392. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988758> >.
- STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p. 987-96, Mar 2005. ISSN 1533-4406. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758009> >.
- TAKEI, N.; NAWA, H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. **Front Mol Neurosci**, v. 7, p. 28, 2014. ISSN 1662-5099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24795562> >.
- TEBBUTT, N.; PEDERSEN, M. W.; JOHNS, T. G. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 9, p. 663-73, Sep 2013. ISSN 1474-1768. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23949426> >.
- VERHAAK, R. G. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, Jan 2010. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20129251> >.
- VITUCCI, M.; HAYES, D. N.; MILLER, C. R. Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy. **Br J Cancer**, v. 104, n. 4, p. 545-53, Feb 2011. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21119666> >.
- WANG, Y. N. et al. Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. **Oncogene**, v. 29, n. 28, p. 3997-4006, Jul 2010. ISSN 1476-5594. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473332> >.
- WEBER, C. K. et al. Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. **Cancer Res**, v. 61, n. 9, p. 3595-8, May 2001. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325826> >.
- YAMAMOTO, T.; TAYA, S.; KAIBUCHI, K. Ras-induced transformation and signaling pathway. **J Biochem**, v. 126, n. 5, p. 799-803, Nov 1999. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10544270> >.

YANG, Y. R. et al. Diverse cellular and physiological roles of phospholipase C- γ 1. **Adv Biol Regul**, v. 52, n. 1, p. 138-51, Jan 2012. ISSN 2212-4934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21964416> >.

_____. The physiological roles of primary phospholipase C. **Adv Biol Regul**, v. 53, n. 3, p. 232-41, Sep 2013. ISSN 2212-4934. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041464>>.

YEWALE, C. et al. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. **Biomaterials**, v. 34, n. 34, p. 8690-707, Nov 2013. ISSN 1878-5905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23953842> >.

ZENG, F.; HARRIS, R. C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. **Semin Cell Dev Biol**, v. 28C, p. 2-11, Apr 2014. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24513230> >.