

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**MODULAÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) EM
SARCOMA DE EWING: IMPACTO NA VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO CELULAR E VIAS DE
SINALIZAÇÃO ASSOCIADAS A NEUROTROFINAS**

NATHÁLIA KERSTING DOS SANTOS

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**MODULAÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) EM
SARCOMA DE EWING: IMPACTO NA VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO CELULAR E VIAS DE
SINALIZAÇÃO ASSOCIADAS A NEUROTROFINAS**

NATHÁLIA KERSTING DOS SANTOS

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2016

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial, a minha avó Norma e minha madrinha Claudia que compartilharam todo esse período de bastante aprendizado e muito esforço.

Aos meus amigos e amigas, alguns deles de uma vida inteira ou de boa parte dela, meu singelo agradecimento por compreenderem momentos de ausência ou por me mostrarem que a vida continuava fora do laboratório (sim isso em alguns momentos é de veras necessário).

Aos meus colegas do Laboratório de Câncer e Neurobiologia pela convivência, pelas risadas, pelas coreografias do melhor *playlist* que o HCPA já ouviu e todos os ensinamentos compartilhados.

Às minhas queridas Danielly, Bárbara e amigos Rafa Santos e Igor (Amigor!!!!), não existe palavras de gratidão que eu possa expressar nesse momento.

À Carol, por toda a ajuda desde de o início até o final me motivando mesmo quando o *western* não ajudava.

Ao professor Rafael, ou simplesmente rafa, por abrir as portas do laboratório a mim e, dentro das possibilidades de uma rotina corrida, conseguir ajudar na construção deste trabalho.

Ao professor Gilberto, pela disponibilidade em aceitar me orientar.

Aos demais, que infelizmente não lembro nessa breve escrita, minha eterna gratidão.

BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor Fábio Klamt

Professor Associado Nível I do Departamento de Bioquímica da UFRGS e orientador do PPG-Bioquímica/UFRGS e PPG-Ciências Médicas/UFRGS. Bolsista CNPq de Produtividade em Pesquisa Nível ID. Tem experiência na área de Bioquímica e Biologia Celular, atuando principalmente nos seguintes temas: estabelecimento de modelos in vitro em neurociências, estudo da patofisiologia dos oxidantes em sistemas biológicos, mecanismos celulares e moleculares envolvidos com a disfunção mitocondrial e morte por apoptose de tumores e em neurônios, e estabelecimento de biomarcadores prognósticos e preditivos em câncer. Membro Afiliado da Academia Brasileira de Ciências (2010).

Professora Doutora Ana Maria Oliveira Battastini

Professora Titular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Experiência na área de Bioquímica, com ênfase em metabolismo extracelular de nucleotídeos (Sinalização Purinérgica), mais recentemente a sinalização purinérgica (receptor P2X7) nos mecanismos moleculares de patologias do sistema nervoso central, com foco na inflamação e na neuroproteção.

Professor Doutor Daniel de Carvalho Damin

Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Chefe do Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Cirúrgicas da UFRGS. Gestor da Área de Coloproctologia do Hospital Mãe de Deus. Possui mestrado e doutorado em Gastroenterologia pela UFRGS. Pós-doutorado pela Universidade de Miami - EUA.

Professor Doutor Lauro José Gregianin

Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da UFRGS, ocupando a função de Chefe da Unidade de Internação Onco-Pediátrica do Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). É membro do Programa Assistencial de Transplante de Células Tronco Hematopoéticas assim como do Colegiado em Oncologia, ambos do HCPA. É Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, UFRGS, desde Jan/2010, na atividade de ensino e orientação de alunos de Mestrado e Doutorado.

RESUMO

A família de Tumores de Ewing pode ser compreendida como um espectro de neoplasias de células neuroectodérmicas primitivas, dentre eles se inclui uma classe menos diferenciada chamada Sarcoma de Ewing (SE), no qual o diagnóstico é mais frequente entre 11 e 20 anos. O índice de sobrevivência pode chegar em 70%; todavia, estima-se que apenas 55% dos pacientes recebam um tratamento efetivo. Alguns estudos sugerem relevância do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) no processo de tumorigênese e metástase em cânceres de cabeça e pescoço, pulmão e colorretal. Algumas vias de sinalização que poderiam explicar a relação do EGFR a estes processos incluem a MAPK/ERK e PI3K/AKT. No entanto, estes complexos de sinalização podem ser ativados por outras cascatas de transdução de sinal como do sistema BDNF/TrkB. As neurotrofinas, mais recentemente, estão sendo relacionadas ao processo tumoral. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a importância de EGF/EGFR na progressão tumoral do Sarcoma de Ewing, bem como o *crosstalk* entre este sistema e neurotrofinas. Linhagens celulares foram expostas a EGF ou ao inibidor da fosforilação do respectivo receptor (AG1478). A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas em hemocítmetro. A análise do ensaio clonogênico foi feita em software *ImageJ*®. Para análise do ciclo celular, após exposição ao AG1478, realizou-se a avaliação por citometria de fluxo e uma provável indução de senescência foi analisada com X-Gal. *Western Blotting* foi padronizado para avaliação das vias MEK/ERK, PI3K/AKT, Ciclina D1, p53 e BDNF quando da exposição ao AG1478. Análises de viabilidade celular também foram feitas usando inibidores de MEK ou PI3K em combinação ao AG1478 ou não. A exposição das linhagens SK-ES-1 e RD-ES ao EGF afeta positivamente a taxa de proliferação destas e, quando essas são tratadas com o inibidor AG1478, existe um decréscimo desta taxa além de um impacto na razão de viabilidade. O índice de citotoxicidade (IC50) resultante é de 12,8uM e 9,8uM para SK-ES-1 e RD-ES, respectivamente. Foi observado que a inibição de EGFR reduziu o número e tamanho de colônias, e que a sua ativação reflete em um aumento dos parâmetros. Alterações das porcentagens populacionais nas fases do ciclo celular foram observadas. O ensaio colorimétrico mostrou aumento da porcentagem de células senescentes e sugere-se envolvimento da via da ERK; AKT; Ciclinas, P53 e BDNF no efeito mediante exposição ao AG1478. A exposição ao EGF, portanto, aumenta a proliferação e a clonogenicidade de células de SE, bem como a diminuição destas quando da inibição do receptor. Também, a inibição de EGFR resulta em alterações no ciclo celular, senescência e morte celular.

ABSTRACT

The family of Ewing's tumors may be understood as a spectrum of primitive neuroectodermal cell neoplasms, including a less differentiated class called Ewing's sarcoma (ES), wherein the diagnosis is most common between 11 and 20 years. The survival rate can reach 70%; however, it is estimated that only 55% of patients receive effective treatment. Some published studies suggest relevance of epidermal growth factor receptor (EGFR) in tumorigenesis and metastatic process in head and neck, lung and colorectal tumors. Some signaling pathways, which could explain its relation with these processes, include MAPK / ERK and PI3K / AKT. However, other signal transduction cascades such as BDNF / TrkB system may activate these signaling complexes, the neurotrophins being related to the tumoral process. This study aims to assess the importance of EGF / EGFR in Ewing's Sarcoma tumor progression, and the crosstalk between this system and neurotrophins. Cell lines were exposed to EGF or the inhibitor of phosphorylation of its receptor (AG1478). The viability and cell proliferation were evaluated in hemocytometer. The analysis of the clonogenic assay was performed in ImageJ[®] software. For cell cycle analysis after exposure AG1478, the evaluation was performed by flow cytometry and a probable induction senescence was analyzed with X-Gal. Western Blot was standardized to evaluate the pathways MEK / ERK, PI3K / AKT, cyclin D1 and P53 when exposure to AG1478. Cell viability analyzes were also performed on exposure to MEK and PI3K inhibitor in combination or not with AG1478. Exposure of SK-ES-1 and RD-ES lines to EGF positively affects the rate of proliferation and when these are treated with the inhibitor AG1478, there is a decrease in this rate as well as an impact on viability. The cytotoxicity index (IC₅₀) is 12,8uM resulting 9,8uM and SK-ES-1 and RD-ES, respectively. We observed that inhibition of EGFR reduced the number and size of colonies, and their activation reflects an increase in the parameters. Changes in population percentages in the cell cycle phases were observed. The colorimetric assay showed an increased percentage of senescent cells and it is suggested involvement of the ERK pathway; AKT; Cyclin P53 and the effect upon exposure AG1478. Therefore, the EGF exposure increases the proliferation and clonogenicity of ES cells, as well as the reduction is observed when these receptor inhibited. Also, inhibition of EGFR results in changes in the cell cycle, senescence and cell death.

LISTA DE FIGURAS DISSERTAÇÃO E ARTIGO

Dissertação:

Figura 1: Quadro esquemático para exemplificar as possíveis translocações já descritas em sarcoma de Ewing. Os pontos numerados seriam sítios de quebras dos quais surgem o *frame de leitura* para a expressão das isoformas de fatores transcricionais aberrantes.

Figura 2: Vias de sinalização celular relacionadas ao EGFR, comuns a outros receptores, em processos fisiológicos e tumorais.

Artigo:

Figuras 1 and 2. *Treatments with EGF increases proliferation and clonogenicity in ES cells.*

Figuras 3 and 4. *Treatments with AG1478 (Thyrsphostin) decrease proliferation and clonogenicity in ES cells.*

Figura 5. *AG1478 induces growth arrest, increase percentage of cells in sub-G1 and reduce poliploidy population.*

Figura 6. *AG1478 increase senescence population in ES lines.*

Figura 7. *Western Blot Analysis of viability, proliferation and neurotrophins associated pathways after exposure to AG1478.*

Figura 8. *Effects of AG1478 and pharmacological inibithors in ES lines.*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AKT (ou PKB): Protein Kinase B (Proteína Cinase B)

AS: Anfirregulinas

BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)

BTC: Betacelulinas

EGF: Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidérmico)

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)

ERK: Extracellular Signal- Regulated Kinases (Cinase Reguladora de Sinal Extracelular)

FISH: *Fluorescent In Situ Hybridization* hibridização *in situ* por Imunofluorescência (Hibridização *in situ* por Imunofluorescência)

GRP: Gastrin-Releasing Peptide (Peptídeo Liberador de Gastrina)

HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2)

HER-3: Human Epidermal Growth Factor Receptor 3 (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 3)

HER-4: Human Epidermal Growth Factor Receptor 4 (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 4)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IGF-1: Insulin-Like Growth Factor Type 1 (Fator de Crescimento Semelhante a Insulina)

MAPK: Mitogen-Activated protein kinases (Proteína Cinase Ativada por Mitógeno)

NGF: Neural Growth Factor (Fator de Crescimento Neural)

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase (Cinase Fosfatidilinositol-3)

TGF α : Alpha Tumor Growth Factor (Fator de Crescimento Transformante Alfa)

TGF β : Beta Tumor Growth Factor (Fator de Crescimento Transformante beta)

Trk: Tropomyosin Related Kinase (Tropomiosina Relacionada à Quinase)

TrkB: Tropomyosin Related Kinase B (Tropomiosina Relacionada à Quinase B)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	06
2	REVISÃO DA LITERATURA	08
2.1	ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	08
2.2	MARCO CONCEITUAL E EPIDEMIOLOGIA	08
2.3	BASES BIOLÓGICAS DO SARCOMA DE EWING	09
2.4	DIAGNÓSTICO	10
2.5	TRATAMENTO: QUIMIOTERAPIA, RESSECÇÃO CIRÚRGICA E/OU RADIOTERAPIA	11
2.6	ALVOS TERAPÊUTICOS E POTENCIAIS TERAPIAS BIOLOGICAMENTE SELETIVAS EM SARCOMA DE EWING	11
2.7	RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)	12
2.8	NEUROTROFINAS E SEUS RECEPTORES- <i>CROSSTALKING</i> COM EGFR	13
3	JUSTIFICATIVA	14
4	OBJETIVOS	15
5	REFERÊNCIAS	16
6	ARTIGO	21
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	43
8	ANEXO	44

1 INTRODUÇÃO

O termo “sarcoma de Ewing” é usado para definir uma família de tumores pediátricos, que inclui o sarcoma de Ewing clássico, o tumor de Askin e outros tipos de tumores primitivos neuroectodérmicos. O grupo dos tumores primitivos neuroectodérmicos inclui ainda o meduloblastoma, neuroblastoma, entre outros. O sarcoma de Ewing é o segundo tipo de tumor ósseo e de tecidos moles mais comum em crianças e está entre os mais agressivos tipos de câncer pediátrico, apresentando alto potencial metastático e resistência aos tratamentos disponíveis, aos quais são baseados em quimioterapia clássica e radioterapia (Chandhanayingyong *et al.*, 2012). Os tumores da família do sarcoma de Ewing apresentam uma alteração biológica comum, que consiste na translocação entre os cromossomos 11 e 21, t(11; 22) (q24; q12), que leva ao surgimento de oncogenes quiméricos formados pela fusão entre o gene EWS com um oncogene ETS. A fusão mais comum, encontrada em 85% dos casos, ocorre entre o segmento 5’ do gene *EWS* e o segmento 3’ do gene *FLI-1*, da família ETS, resultando na produção da proteína EWS-FLI-1, a qual age como ativador aberrante da transcrição gênica, provocando as alterações celulares relacionadas ao surgimento da doença, bem como a resistência desta (Balamuth e Womer, 2010; Kovar, 1998; Riggi e Stamenkovic, 2007). Neste contexto de alterações secundárias, em outros tipos de câncer, níveis elevados de EGFR e respectivos ligantes foram identificados como um componente comum e parecem promover o crescimento do tumor. A ativação deste receptor desencadeia uma extensa rede de vias de transdução de sinais que incluem ativação de PI3K/Akt, RAS/ERK e JAK/STAT, as quais estão intimamente envolvidas na regulação da proliferação, diferenciação, sobrevivência e adesão celular (Muthuswamy *et al.*, 1999, Belsches-Jablonski *et al.*, 2001, Henson & Gibson 2006, Yarden 2001). Além disso, estas vias são associadas ao aumento do potencial metastático e resistência à quimioterapia e radioterapia em cânceres de mama, pulmão, cabeça e pescoço, gliomas, colorretal e carcinomas renais (Herbst & Langer 2002, Nicholson *et al.*, 2001, Brunetto de Farias *et al.*, 2010). Ainda em relação a estes complexos de sinalização, é interessante ressaltar sua ativação por outros sistemas ligante-receptor, como ocorre através das vias desencadeadas por neurotrofinas, as quais são importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento e plasticidade neuronal, além de estarem envolvidas na tumorigênese de diversos tipos de câncer (Huang & Reichardt 2001, Brunetto de Farias *et al.*, 2010). Interessante avaliar, portanto, a possível interferência mútua nos

alvos de ativação entre BDNF/TrkB e EGF/EGFR, considerando-os potenciais alvos moleculares na terapia anti-câncer (Normanno *et al.*, 2006, Reichardt 2006).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura está focada no entendimento de vias de sinalização inerentes ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), e neurotrofinas, com relação a progressão tumoral do Sarcoma de Ewing. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: banco de dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), PubMed e Scopus no período de 1995-2016. Foram realizadas buscas através dos termos: “*Ewing’s Cancer*”; “*Signal Pathways of Ewing*”, “*EGFR AND Ewing*”, “*Neurotrophis AND Cancer*”, “*AG1478 AND Truncate Receptor*”, “*Thyrphostin AND Câncer*”

TERMOS	RESULTADO DA PESQUISA		Artigos Utilizados	
	PubMed	Scopus	PubMed	Scopus
<i>Ewing’s Cancer</i>	4344	7754	30	17
<i>Signal Pathways of Ewing</i>	189	261	20	12
<i>EGFR AND Ewing</i>	12	26	5	1
<i>Neurotrophic factors AND Cancer</i>	1734	1700	15	4
<i>AG1478 AND Truncate Receptor</i>	10	0	3	0
<i>Thyrphostin AND Câncer</i>	905	0	20	0
<i>EGFR AND Neurotrophic Factors</i>	53	79	5	6

2.2 MARCO CONCEITUAL E EPIDEMIOLOGIA

“Sarcoma de Ewing” é uma família de tumores pediátricos, que inclui o Sarcoma de Ewing clássico, o tumor de Askin e outros tipos de tumores primitivos neuroectodérmicos (Chandhanayingyong *et al.*, 2012). A etnia caucasiana apresenta maiores taxas de desenvolvimento, sendo raro o aparecimento em afrodescendentes e asiáticos. O diagnóstico é mais frequente, cerca de 64%, na faixa dos 11 aos 20 anos, seguido da faixa até 10 anos e de 9% entre 21 e 30 anos. Em questões de gênero, existe uma prevalência maior no sexo masculino (Iwamoto 2007, Karosas 2010). Quanto a localização, é frequente na pelve, fêmur, tíbia, úmero e parede torácica, mas pode acometer qualquer osso, sendo mais comum nos ossos longos como fêmur e tíbia, e tipicamente uma lesão diafisária (Jedlicka 2010).

Nos Estados Unidos, 80% dos casos ocorrem antes dos 18 anos. No Reino Unido, estima-se uma média de 6 crianças por ano com o diagnóstico (Esiashvili, *et al.* 2008, Maki 2008). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em suas últimas publicações, em 2008 e 2012, não traz dados específicos sobre Sarcoma de Ewing, no entanto revela que na soma de cânceres ósseos pediátricos, estes representam 6,7% de todos os tumores da infância. Cerca de 700 crianças são diagnosticadas a cada ano com este tipo de tumor, dos quais aproximadamente 400 são osteossarcomas e 200 são Sarcoma de Ewing.

A sobrevida estimada em cinco anos na doença localizada, ou seja, não metastática, situa-se entre 50 e 70% (Burdach *et al.*, 2005, Scotlandi *et al.*, 2006). O tratamento quimioterápico a partir da década de 1970 e sua evolução contribuíram para a melhora do prognóstico; porém, na doença metastática permanece desfavorável, ficando a sobrevida entre 18 e 30% (Holcombe *et al.*, 2003).

2.3 BASES BIOLÓGICAS DO SARCOMA DE EWING

A característica comum a todos os subtipos de tumores da família do Sarcoma de Ewing consiste em uma anormalidade cromossômica derivada de uma translocação entre os cromossomos 11 e 22, t(11;22) (q24; q12), levando a formação de oncogenes. A fusão mais comum, encontrada em 90% dos casos, ocorre entre o segmento 5' do gene EWS e o segmento 3' do gene FLI-1, da família ETS, resultando na produção da proteína EWS-FLI-1. O novo arranjo genômico pode ser detectado por hibridização *in situ* por Imunofluorescência (em inglês: Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) e reação da cadeia da polimerase (PCR, sigla em inglês). Sugere-se que esta alteração tenha como consequência a ativação aberrante da transcrição gênica, provocando as alterações celulares relacionadas ao surgimento da doença (Balamuth & Womer, 2010; Kovar, 1998; Riggi & Stamenkovic, 2007). Sua característica antigênica comum é a expressão na superfície da célula de uma molécula de adesão, a glicoproteína MIC2, que pode ser detectada por um número de anticorpos monoclonais (INCA 2014). Outro dado biologicamente relevante é o fato das células de Sarcoma de Ewing apresentarem características de células-tronco mesenquimais, as quais podem conferir ao tumor características que levem a um processo de resistência, ou mesmo de progressão tumoral (Lin *et al.*, 2011, Amaral *et al.*, 2014).

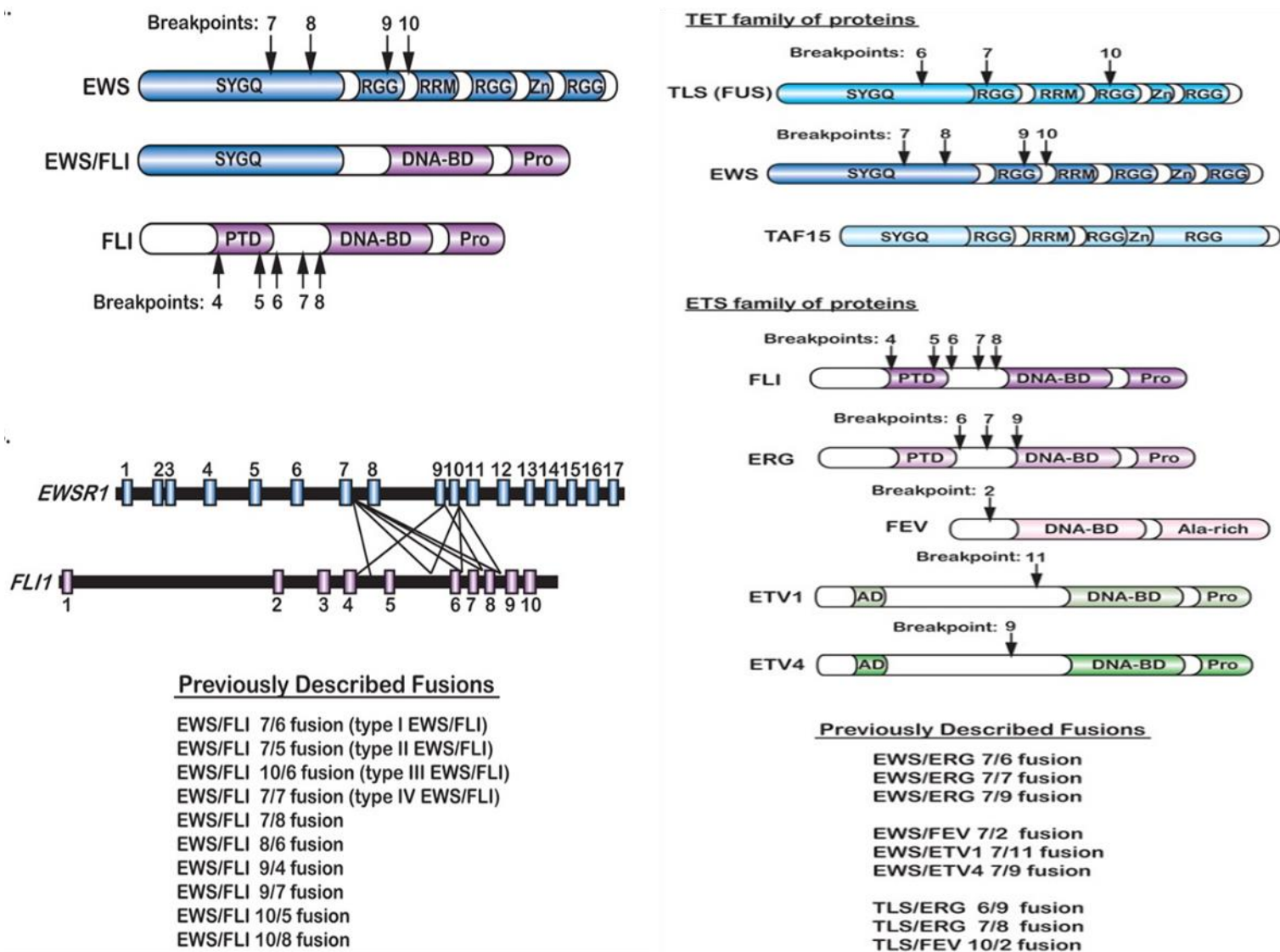


Figura 1: Quadro esquemático para exemplificar as possíveis translocações já descritas em sarcoma de Ewing. Os pontos numerados seriam sítios de quebras dos quais surgem o *frame de leitura* para a expressão das isoformas de fatores transcricionais aberrantes (adaptado de Sankar *et al.*, 2011).

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de Sarcoma de Ewing, bem como dos tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos, pode ser feito através da radiografia, onde pode-se observar lesões líticas ou mistas (lítica e esclerótica) com o aspecto característico de "casca de cebola" (INCA, 2014). Além disso é rotina em centros de referência a biópsia seguida de painel imunohistoquímico para os seguintes marcadores: CD99, Sinaptofisina, Desmina, FL1, HNF35 (Werner *et al.*, 2005)

2.5 TRATAMENTO: QUIMIOTERAPIA, RESSECÇÃO CIRÚRGICA E/OU RADIOTERAPIA.

Antes da introdução de quimioterapia, apenas 10% dos pacientes com Sarcoma de Ewing sobreviviam, sendo que hoje esta taxa em pacientes com tumores localizados é cerca de 70%. Entretanto, estima-se que apenas 55% dos pacientes recebam um tratamento realmente efetivo, e cerca de 50% dos pacientes apresentam recidivas. O tratamento atual consiste em uma quimioterapia pré-operatória, a qual segue protocolo estabelecido por Ladenstein e colaboradores (2010) onde aplica-se seis ciclos de vincristina, ifosfamida, doxorrubicina, etoposideo, um ciclo de vincristina, dactinomicina e ifosfamida, seguido de um tratamento local com cirurgia e/ou radioterapia. O mesmo estudo foi replicado com perfis clínicos diferentes, demonstrando a validade externa do protocolo (Ladenstein, 2010, Kovar, 2012, Le Deley, 2014, Maldegem, 2015, Liebner, 2015).

2.6 ALVOS TERAPÊUTICOS E POTENCIAIS TERAPIAS BIOLOGICAMENTE SELETIVAS EM SARCOMA DE EWING

Uma estratégia para inibir experimentalmente o crescimento tumoral em Sarcoma de Ewing é a inibição da proteína resultante da alteração genética básica encontrada nesse tipo de câncer, isto é, a fusão EWS-FLI1. De fato, um cDNA *antisense* contra o gene EWS-FLI1 inibe a proliferação de linhagens celulares de Sarcoma de Ewing (Kovar *et al.*, 1996). Entretanto, outros mecanismos celulares podem estar modificados, além da alteração genética primária, de forma consequente ou sem relação causal direta com esta, e apresentar um papel determinante no crescimento tumoral. Podemos considerar estes mecanismos de escape como uma resistência tumoral, a qual é regida por três processos: a quiescência (diminuição na proliferação celular, ficando em estágio G0), o aumento no reparo de DNA, bem como a inativação de vias apoptóticas. Este último torna-se possível, uma vez que, no Sarcoma de Ewing e outros diversos tumores, as células cancerígenas podem inibir a apoptose por perturbar vias pró-apoptóticas, em especial p16 / p53/p14ARF (Ahmed, 2014).

Outros mecanismos relacionados à resistência tumoral estão bem descritos na literatura e sugerem, portanto, a função de fatores de crescimento no desenvolvimento tumoral de Ewing (Guan *et al.*, 2009, Jedlicka 2010, Borinstein *et al.*, 2011, Applebaum *et al.*, 2014). A literatura sugere ainda mecanismos de escape, seja pelo aumento na expressão de determinado fator, como no caso da terapêutica

com anti-VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), causando aumento da Angiopoetina 1, ou de algum receptor, quando da inibição do EGF, aumentando a expressão de EGFR (Huang *et al.*, 2009).

2.7 RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)

A família do EGFR compreende quatro receptores distintos: EGFR / ErbB-1 e os receptores do fator de crescimento epidérmico humano 2, 3 e 4 (siglas em inglês: HER-2, HER-3 E HER-4). Estes receptores transmembranas são compostos de um domínio de ligação extracelular e uma região citoplasmática com atividade enzimática (Ferguson *et al.*, 2003, Yarden, 2001). Diferentes ligantes chamados de moléculas cognatas ao EGF, como o fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), *neuregulins*, anfirregulinas (AS), betacelulinas (BTC) e fator de crescimento ligante de heparina ativam o receptor por ligação ao domínio extracelular e induzem a formação de homodímeros ou heterodímeros, desencadeando o processo de fosforilação cruzada entre os resíduos de tirosina e a formação de locais de ancoragem para complexos, os quais são compostos por enzimas citoplasmáticas e proteínas adaptadoras. A dissociação subsequente destes permite a ativação de uma extensa rede de vias de transdução de sinais que incluem ativação de PI3K/Akt, RAS/ERK e JAK/STAT, as quais estão intimamente envolvidas na regulação da proliferação, diferenciação, sobrevivência e adesão celular (Muthuswamy *et al.*, 1999, Belsches-Jablonski *et al.*, 2001, Henson & Gibson 2006, Yarden 2001). O sistema ligante-receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), também está envolvido no desenvolvimento embrionário precoce e na renovação das células tronco em tecidos normais, tais como a pele, fígado e intestino (Williams *et al.*, 1993). É importante salientar, ainda, que todo este processo de sinalização celular pode ser desencadeado de maneira autócrina ou parácrina (Normanno *et al.*, 2006).

Os níveis elevados de EGFR e respectivos ligantes foram identificados como um componente comum de vários tipos de câncer e parecem promover o crescimento do tumor sólido. A literatura sugere sua associação a eventos como inibição de apoptose, angiogênese, aumento do potencial metastático e resistência a quimioterapia e radioterapia em cânceres de mama, pulmão, cabeça e pescoço, gliomas, colorretal e carcinomas renais (Herbst & Langer 2002; Nicholson *et al.*, 2001; Brunetto de Farias *et al.*, 2010). Em virtude disso, EGFR é alvo de diferentes

estratégias terapêuticas, que vão desde anticorpos monoclonais até inibidores de proteínas cinase (Applebaum, Thomas *et al.*, 2014; Blumenberg 2014; Trivedi, Concha-Benavente *et al.*, 2014; Ugurluer and Ozsahin 2014). Estudos mais recentes sugerem que o EGFR possa estar também envolvido no processo tumoral do Sarcoma de Ewing (Applebaum *et al.*, 2014, Hughes 2009). Pesquisas *in vitro* com linhagem de osteossarcoma relacionam a inibição do receptor com o fármaco Cetuximabe, inibidor de EGFR, a um aumento da atividade citolítica, sugerindo; portanto, alguma eficácia (Pahl *et al.*, 2012). No entanto, a mesma metodologia terapêutica não funcionou em experimento *in vivo* com modelos de Sarcoma de Ewing, mostrando talvez algum processo de resistência (Chernoguz *et al.*, 2012). Diversas alterações neste receptor como amplificação de genes, rearranjos estruturais e mutações somáticas podem ocorrer em diferentes tumores, gerando um perfil de resistência. É descrito na literatura a amplificação da variante III deste receptor (EGFRvIII) em gliomas, o que desencadeia a fosforilação permanente e, portanto, uma transdução de sinal constitutiva (Hatanpaa KJ *et al.*, 2010). Outra questão que confere importância deste receptor ao processo tumoral é a possibilidade de ligação a membrana nuclear mesmo depois do processo de internalização mediante tratamento com algum potencial inibidor (Brand TM *et al.*, 2011; 2013). Logo existe a necessidade de um maior estudo da estrutura molecular com o objetivo de torna-lo mais sensível à exposição farmacológica. Uma possível estratégia seria a inibição deste a partir de sítios fundamentais no processo catalítico que, evolutivamente, devem ser conservados. Neste contexto, existe apenas um trabalho descrito, no qual Andersson e colaboradores (2008) mostram uma eficácia parcial na exposição de duas linhagens de Sarcoma de Ewing ao inibidor intracitoplasmático Gefitinibe, mas sem aparente resultado nas vias diretamente desencadeados por EGFR, sendo questionada a validade terapêutica, bem como a afinidade da molécula ao receptor (Andersson *et al.*, 2014). Outra questão envolvida neste caso é expressão de EGFR para cada linhagem, lembrando que ela se trata apenas de um modelo dentro de um espectro muito maior que compreende a neoplasia em questão.

2.8 NEUROTROFINAS E SEUS RECEPTORES- CROSSTALKING COM EGFR

Neurotrofinas, como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), e seus receptores quinase relacionados à tropomiosina (*tropomyosin related kinase*, ou Trk) são importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento e plasticidade neuronal (Huang & Reichardt 2001). A ligação entre neurotrofina e receptor leva a formação de um homodímero e a fosforilação de resíduos de

tirosina, para, assim, ocorrer a transdução da sinalização celular (Guiton *et al.*, 1994, Huang & Reichardt, 2001, Lessmann *et al.*, 2003). Sabe-se que essa transdução de sinal tem relação com a ativação de vias intracelulares como a da Ras e MAPK, promovendo a diferenciação e crescimento celular, e a ativação de PI3K que promoveria a sobrevivência celular. Interessante considerar, portanto, a possível interferência mútua nos alvos de ativação entre BDNF/TrkB e EGF/EGFR (Normanno *et al.*, 2006, Reichardt 2006, de Farias *et al.*, 2012).

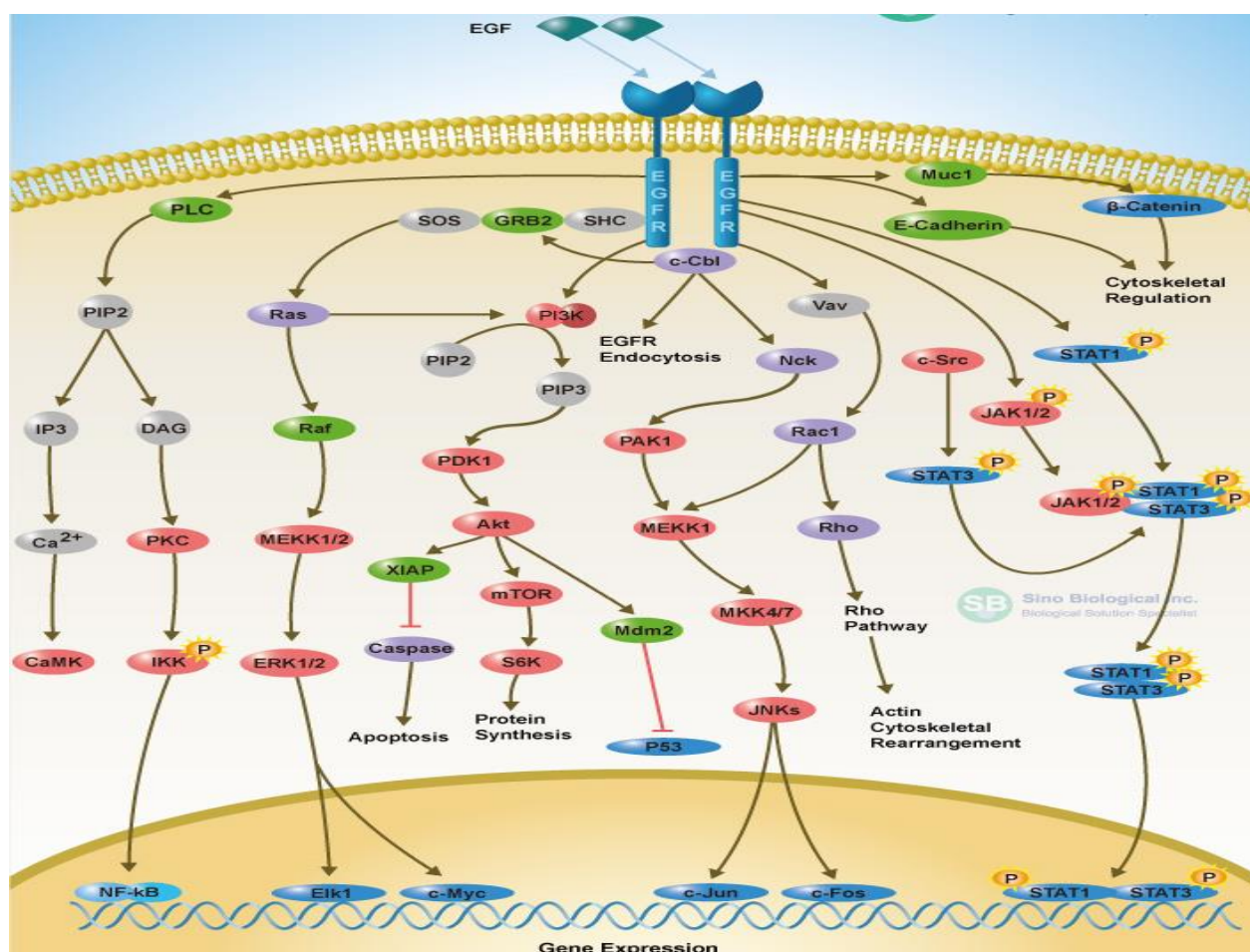


Figura 2: Vias de sinalização celular relacionadas ao EGFR, comuns a outros receptores, em processos fisiológicos e tumorais. (Rodrigues *et al.*, 2010)

3. JUSTIFICATIVA

Uma vez que na prática clínica as medidas terapêuticas não se mostram eficazes, principalmente no caso do Sarcoma de Ewing com perfil metastático, faz-se necessário o entendimento de outras vias de sinalização inerentes ao crescimento tumoral e que poderiam ser fundamentais para a manutenção deste. Considerando que a inibição da sinalização através de receptores de EGF, utilizando anticorpos monoclonais ou inibidores de tirosina-cinases, tem revelado resultados promissores em várias neoplasias, o presente trabalho tem por objetivo

estudar o papel desta via de sinalização em linhagens celulares de Sarcoma de Ewing.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Primário

Avaliar a importância do sistema EGF/EGFR para a manutenção do status tumoral do Sarcoma de Ewing a partir análise da proliferação celular e de vias de sinalização associadas a neurotrofinas.

4.2 Objetivos Secundário

- 4.1.1 Padronizar o cultivo celular das linhagens de Sarcoma de Ewing SK-ES-1 e RD-ES
- 4.1.2 Avaliar o impacto na proliferação celular das linhagens celulares SK-ES-1 e RD-ES, após a exposição ao EGF, ou ao inibidor da fosforilação de EGFR (AG1478), a partir de metodologia de contagem por exclusão com azul de tripan, clonogênico, citometria de fluxo e ensaio de senescência.
- 4.1.3 Avaliar as possíveis vias de sinalização celular envolvidas na transdução de sinal desencadeada pelos sistemas EGF/EGFR BDNF/TrkB a partir das seguintes técnicas:
 - 4.1.3.1 Ensaio de *Western Blot* para as vias de ERK, AKT, Ciclina D1, p53 e BDNF mediante exposição ao AG1478;
 - 4.1.3.2 Exposição das linhagens a inibidores das vias MEK/ERK e PI3K/AKT isoladamente ou em combinação ao AG1478.

5 REFERÊNCIAS

Amaral, A. T., M. C. Manara, D. Berghuis, J. L. Ordonez, M. Biscuola, M. A. Lopez-Garcia, D. Osuna, E. Lucarelli, F. Alviano, A. Lankester, K. Scotlandi and E. de Alava (2014). "Characterization of human mesenchymal stem cells from ewing sarcoma patients. Pathogenetic implications." *PLoS One* 9(2): e85814.

Andersson, M. K. and P. Aman (2008). "Proliferation of Ewing sarcoma cell lines is suppressed by the receptor tyrosine kinase inhibitors gefitinib and vandetanib."

Cancer Cell Int **8**: 1.

Applebaum, M. A., D. G. Thomas, T. Hembrough, J. Burrows, A. E. Horvai, E. R. Lawlor and S. G. DuBois (2014). "Comparative evaluation of strategies for quantifying signaling pathway proteins in ewing sarcoma." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 22(8): 593-599.

Belsches-Jablonski, A. P., J. S. Biscardi, D. R. Peavy, D. A. Tice, D. A. Romney and S. J. Parsons (2001). "Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival." *Oncogene* 20(12): 1465-1475.

Blumenberg, M. (2014). "Differential Transcriptional Effects of EGFR Inhibitors." *PLoS One* 9(9): e102466.

Brunetto de Farias, C., D. B. Rosemberg, T. E. Heinen, P. Koehler-Santos, A. L. Abujamra, F. Kapczinski, A. L. Brunetto, P. Ashton-Prolla, L. Meurer, M. Reis Bogo, D. C. Damin, G. Schwartzmann and R. Roesler (2010). "BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer." *Oncology* 79(5-6): 430-439.

Burdach, Stefan, A. Meyer-Bahlburg, H. J. Laws, R. Haase, B. Van Kaik, B. Metzner, A. Wawer, et al. 2003. "High-Dose Therapy for Patients with Primary Multifocal and Early Relapsed Ewing's Tumors: Results of Two Consecutive Regimens Assessing the Role of Total-Body Irradiation." *Journal of Clinical Oncology* 21 (16): 3072–78. doi:10.1200/JCO.2003.12.039.

de Farias CB, Heinen TE, dos Santos RP, Abujamra AL, Schwartzmann G, Roesler R.(2012)" BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition". *Biochem Biophys Res Commun*; 425(2):328-32.

Chandhanayingyong, C., Y. Kim, J. R. Staples, C. Hahn and F. Y. Lee (2012). "MAPK/ERK Signaling in Osteosarcomas, Ewing Sarcomas and Chondrosarcomas: Therapeutic Implications and Future Directions." Sarcoma **2012**: 404810.

Chernoguz, A., K. Crawford, E. Donovan, A. Vandersall, C. Berglund, T. P. Cripe and J. S. Frischer (2012). "EGFR inhibition fails to suppress vascular proliferation and tumor growth in a Ewing's sarcoma model." *J Surg Res* **173**(1): 1-9.

Eggert, A., N. Ikegaki, X. G. Liu and G. M. Brodeur (2000). "Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma." *Klin Padiatr* 212(4): 200-205.

Esiashvili, N., M. Goodman and R. B. Marcus, Jr. (2008). "Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data." *J Pediatr Hematol Oncol* **30**(6): 425-430.

Ferguson, K. M., M. B. Berger, J. M. Mendrola, H. S. Cho, D. J. Leahy and M. A. Lemmon (2003). "EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization." *Mol Cell* 11(2): 507-517

Guan, H., Z. Zhou, Y. Cao, X. Duan and E. S. Kleinerman (2009). "VEGF165 promotes the osteolytic bone destruction of ewing's sarcoma tumors by upregulating RANKL." *Oncol Res* 18(2-3): 117-125.

Guiton, M., F. J. Gunn-Moore, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos and J. M. Tavaré (1994). "Identification of in vivo brain-derived neurotrophic factor-stimulated autophosphorylation sites on the TrkB receptor tyrosine kinase by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 269(48): 30370-30377.

Herbst, R. S. and C. J. Langer (2002). "Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers." *Semin Oncol* 29(1 Suppl 4): 27-36.

Holcombe E. Grier, M.D., Mark D. Krailo, Ph.D., Nancy J. Tarbell, M.D., M.D. Michael P. Link, M.D., Christopher J.H. Fryer, M.D., Douglas J. Pritchard, M.D. Mark C. Gebhardt, M.D., Paul S. Dickman, M.D., Elizabeth J. Perlman, M.D. Paul A. Meyers, M.D., Sarah S. Donaldson, M.D., Sheila Moore, and M.D. Aaron R. Rausen, M.D., Teresa J. Vietti, M.D., and James S. Miser. 2003. "Addition of Ifosfamide and Etoposide to Standard Chemotherapy." *The New England Journal of Medicine*, no. 348: 694–701. doi:10.1056/NEJMoa020890.

http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/tumores_ewing.

Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.

Huang, J., J. O. Bae, J. P. Tsai, A. Kadenhe-Chiweshe, J. Papa, A. Lee, S. Zeng, Z. N. Kornfeld, P. Ullner, N. Zaghloul, E. Ioffe, S. Nandor, E. Burova, J. Holash, G. Thurston, J. Rudge, G. D. Yancopoulos, D. J. Yamashiro and J. J. Kandel (2009).

"Angiopoietin-1/Tie-2 activation contributes to vascular survival and tumor growth during VEGF blockade." Int J Oncol **34**(1): 79-87.

Jaeger M, Nör C, de Farias CB, Abujamra AL, Schwartzmann G, Brunetto AL, Roesler R.(2013)" Anti-EGFR therapy combined with neuromedin B receptor blockade induces the death of DAOY medulloblastoma cells".

Jedlicka, P. (2010). "Ewing Sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by transcription factor oncogenic fusions." Int J Clin Exp Pathol **3**(4): 338-347.

Iwamoto, Y. (2007). "Diagnosis and treatment of Ewing's sarcoma." Jpn J Clin Oncol **37**(2): 79-89.

Karosas, A. O. (2010). "Ewing's sarcoma." Am J Health Syst Pharm **67**(19): 1599-1605.

Maki, R. G. (2008). "Pediatric sarcomas occurring in adults." J Surg Oncol **97**(4): 360-368.

Kovar, H., D. N. Aryee, G. Jug, C. Henockl, M. Schemper, O. Delattre, G. Thomas and H. Gadner (1996). "EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro." Cell Growth Differ **7**(4): 429-437.

Ladenstein, R., U. Potechger, M. C. Le Deley, J. Whelan, M. Paulussen, O. Oberlin, H. van den Berg, U. Dirksen, L. Hjorth, J. Michon, I. Lewis, A. Craft and H. Jurgens (2010). "Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial." J Clin Oncol **28**(20): 3284-3291.

Lessmann, V., K. Gottmann and M. Malcangio (2003). "Neurotrophin secretion: current facts and future prospects." Prog Neurobiol **69**(5): 341-374

Lin, P. P., Y. Wang and G. Lozano (2011). "Mesenchymal Stem Cells and the Origin of Ewing's Sarcoma." Sarcoma 2011

Muthuswamy, S. K., M. Gilman and J. S. Brugge (1999). "Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers." Mol Cell Biol **19**(10): 6845-6857.

Ma W, Xu M, Liu Y, Liu H, Huang J, Zhu Y, Ji LJ, Qi X.(2014)." Safety profile of combined therapy inhibiting EFGR and VEGF pathways in patients with advanced non-small-cell lung cancer: A meta-analysis of 15 phase II/III randomized trials". Int J Cancer. 2014 Dec 4. doi: 10.1002/ijc.29377.

Nicholson, R. I., J. M. W. Gee and M. E. Harper (2001). "EGFR and cancer prognosis." European Journal of Cancer **37**, Supplement 4(0): 9-15.

Normanno, N., A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M. R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro and D. S. Salomon (2006). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer." *Gene* 366(1): 2-16.

Pahl, J. H., S. E. Ruslan, E. P. Buddingh, S. J. Santos, K. Szuhai, M. Serra, H. Gelderblom, P. C. Hogendoorn, R. M. Egeler, M. W. Schilham and A. C. Lankester (2012). "Anti-EGFR antibody cetuximab enhances the cytolytic activity of natural killer cells toward osteosarcoma." *Clin Cancer Res* 18(2): 432-441.

Qiu L, Zhou C, Sun Y, Di W, Scheffler E, Healey S, Kouttab N, Chu W, Wan Y (2006). "Crosstalk between EGFR and TrkB enhances ovarian cancer cell migration and proliferation". *Int J Oncol.* 2006 Oct;29(4):1003-11.

Reichardt, L. F. (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1473): 1545-1564.

Riggi, N. and I. Stamenkovic (2007). "The Biology of Ewing sarcoma." *Cancer Lett* **254**(1): 1-10.

Rodrigues, M., L. G. Griffith and A. Wells (2010). "Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells." *Stem Cell Res Ther* 1(4): 32.

Scotlandi, Katia, Stefania Perdichizzi, Ghislaine Bernard, Giordano Nicoletti, Patrizia Nanni, Pier Luigi Lollini, Antonio Curti, et al. 2006. "Targeting CD99 in Association with Doxorubicin: An Effective Combined Treatment for Ewing's Sarcoma." *European Journal of Cancer* 42 (1): 91–96. doi:10.1016/j.ejca.2005.09.015.

Trivedi, S., F. Concha-Benavente, R. M. Srivastava, H. B. Jie, S. P. Gibson, N. C. Schmitt and R. L. Ferris (2014). "Immune biomarkers of anti-EGFR monoclonal antibody therapy." *Ann Oncol.*

Sankar, S., & Lessnick, S. L. (2011). Promiscuous Partnerships in Ewing's Sarcoma. *Cancer Genetics*, 204(7), 351–365. <http://doi.org/10.1016/j.cancergen.2011.07.008>

Ugurluer, G. and M. Ozsahin (2014). "Early investigational drugs that target epidermal growth factor receptors for the treatment of head and neck cancer." *Expert Opin Investig Drugs*: 1-18.

Werner, Betina, Antonio Carlos Campos, Mehdad Nadji, and Luiz Fernando Bleggi Torres. 2005. "Practical Use of Immunohistochemistry in Surgical Pathology." *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial* 41 (5): 353–64. doi:10.1590/S1676-24442005000500011.

Williams, R., J. Sanghera, F. Wu, D. Carbonaro-Hall, D. L. Campbell, D. Warburton, S. Pelech and F. Hall (1993). "Identification of a human epidermal growth factor

receptor-associated protein kinase as a new member of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase family." *J Biol Chem* 268(24): 18213-18217.

Yarden, Y. (2001). "The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities." *European Journal of Cancer* 37, Supplement 4(0): 3

6. ARTIGO

MODULATION OF EGFR IN EWING SARCOMA: IMPACT ON VIABILITY, CELL PROLIFERATION AND SIGNALING PATHWAYS ASSOCIATED WITH NEUROTROPHINS

Nathália Kersting dos Santos¹, Bárbara Kunzler Souza¹, Igor Araujo Vieira³, Rafael Pereira dos Santos¹, Danielly Brufatto Olguins¹, Lauro José Gregianin^{5,6}, Algemir Lunardi Brunetto⁴, Rafael Roesler^{1,2,4}, Caroline Brunetto de Farias^{1,4}, Gilberto Schwartzmann^{1,7}.

¹Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

²Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. ³Laboratory of Genomic Medicine, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. ⁴Children's Cancer Institute, 90420-140 Porto Alegre, RS, Brazil. ⁵Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. ⁶Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. ⁷Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Periódico: Cellular Oncology Journal

Status: A Submeter

ABSTRACT

Some previous studies suggest relevance of epidermal growth factor receptor (EGFR) in tumorigenesis and metastatic process. Signaling pathways, which could explain its relation with these processes, include ERK and AKT. However, other signal transduction cascades such as BDNF / TrkB may activate these signaling complexes. This study aims to assess the importance of EGFR in Ewing's Sarcoma tumor progression. Cell lines were exposed to EGF or AG1478. The viability and cell proliferation were evaluated in hemocytometer and ImageJ[®] software. Cell cycle analysis after exposure AG1478 was performed by flow cytometry and induction senescence was analyzed by colorimetric assay. Western Blott was standardized to evaluate the pathways ERK, AKT, cyclin D1, P53 and BDNF when exposure to AG1478. Cell viability analyzes were also performed on exposure to MEK and PI3K inhibitor in combination or not with AG1478. The exposure of cell lines to EGF positively affected proliferation rate and when these are treated with the inhibitor AG1478, there is a decrease in number of viable cells. We observed that inhibition of EGFR reduced the number and size of colonies, and their activation reflects an increase in the parameters. Changes in population percentages in the cell cycle phases were observed. The colorimetric assay showed an increase of senescent cells. This process and the others analyzed appear to be modulated by alterations in the ERK and AKT pathways, cyclin D1 and p53, as well as crosstalking with the BDNF / TrkB complex.

Keywords

Ewing Sarcoma; Epidermal Growth Factor Receptor System; Proliferations Pathways; BDNF

INTRODUCTION

The family of Ewing's tumors may be understood as a spectrum of primitive neuroectodermal tumors, including a less differentiated class called Ewing sarcoma, the second type of bone and soft tissue tumor most common in childhood and one of the most aggressive types of pediatric cancer. The main causal factor is a chromosomal translocation- t(11; 22) (q24; q12) leading to production of EWS-FLI-1 protein, which acts as a gene transcription aberrant activator causing cellular changes related to disease onset as well as the resistance of this [1-3]. The diagnosis is more frequent, about 64%, ranging from 11 to 20 years, followed the track up to 10 years and 9% between 21 and 30 years. Before the introduction of chemotherapy, only 10% of patients with this cancer survived, whereas today this ratio is 70%. However, it is estimated that only 55% of patients get an effective treatment and about 50% of patients have relapses. Therefore, it is necessary a greater understanding of the processes underlying carcinogenesis and tumor resistance. In this context, the system composed by epidermal growth factor receptor (EGFR) and the EGF-family of peptide growth has a central role in the pathogenesis and progression of different tumor types [4-5].

The EGF ligand/receptor is also involved in early embryonic development and in the renewal of stem cells in normal tissues such as the skin, liver and gut [6]. Within the group of tumors comprising the neuroectodermal tumors, there is the hypothesis that this factor and its path can be linked to the metastatic potential of medulloblastomas (Rico-Varela *et al.*, 2015). Recently, our research group showed *in vitro* efficacy of anti-EGFR therapy [8]. The activation of this receptor triggers the induction of the PI3K/Akt and RAS/ERK signaling pathways closely involved in the regulation of proliferation, differentiation and cell survival [9-12]. Tropomyosin-related kinase (TrkB) and its ligand BDNF have been detected in various human cancers, including neuroblastoma, pancreas, colon, stomach and multiple myeloma, and associated with a poor prognosis in certain tumor types [13-22]. Recent reports indicated that TrkB can also be transactivated through EGFR signaling and thus regulates both neurophysiological and carcinogenesis process [23-25].

The aim of this study is to evaluate tumor status of Ewing Sarcoma through the modulation of EGF/EGFR system and its influence in associated neurotrophins pathways. Here we suggest that modulation of EGF/EGFR system affects the proliferation and clonogenicity of ES cells. Additionally, inhibition of EGFR leads to changes in cell cycle, senescence phenomenon, proliferation pathways and cell death.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and reagent treatments

Human cell lines (SK-ES-1 and RD-ES) obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA). Then were grown in RPMI-1640 medium (Gibco-BRL, Carlsbad, CA), containing 0.1% Fungizone (250 mg/kg; Invitrogen, São Paulo, Brazil), 0,1% Gentamicin (40mg/ml; Nova Pharma, Jardim Anápolis, Brazil), and 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, São Paulo, Brazil), at 37 °C in a humidified incubator under 5% CO₂ . Experiments were conducted in the exponentially growing cell cultures and treated accordingly to experimental groups.

Selective EGFR inhibitor named Tyrphostin- AG 1478 and human recombinant EGF were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The AG 1478 and EGF vehicles were respectively ethanol (Merck & Co., Inc) and acetic acid (Nuclear Ltda). The choice of this EGFR inhibitor was based on previous studies which showed an effective blockade of both wild-type and mutated receptors [26-27].

Cellular proliferation and colony formation assays

Cells were seeded at a density of 3×10^4 cells/ well in 24-well plates (BD Biosciences, USA). After 24 h, lineages were treated with chosen concentrations of EGF (0.01, 0.1 and 1µg/mL) or AG 1478 (5, 10, 20 and 40 µM) [28-31]. When treated with EGF, FBS supplementation in medium was reduced to 0,5%. The medium was collected 72 h after treatments; cells were detached with trypsin without EDTA and counted using a hemocytometer. For colony formation assay, 1×10^3 cells/ well were replated in duplicates in 6-well plates. After being incubated and monitored for 10 days, the cells were fixed in 70% ethanol and counterstained with 0.5% crystal violet. Images of each plate were obtained with a desktop scanner (L-pix Chemi Molecular Imaging, Loccus Biotecnologic). For analysis of the clonogenic images, optimized digital colony counts were performed with ImageJ software (version 1.37 for Windows) as described by dos Santos *et al* (2014)[32]. Treatment effects were expressed as colony and intensity area according to Guzmán and colleagues (2014) [33].

Cell Cycle Analysis

For cell cycle assessment, 3×10^4 cells were plated in 24-well plates, followed by EGFR inhibitor treatment for 48 h. Then, both floating and attached cells were harvested, washed with PBS twice, and resuspended in 50 µg/mL Propidium Iodide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.1% Triton X-100 (Labsynth) in a 0.1% sodium citrate solution. Cells were incubated on ice for 15 minutes prior to analysis

using the flow cytometer Attune[®] Acousting Focusing Cytometer (Applied Biosystems) and data was analyzed using Attune[®] software. An area parameter histogram was employed to evaluate each cell population in certain cycle phase (sub-G1/G0, G1, S and G2). Given the cytogenetic profile of these lineages, polyploidy group was determined.

Senescence Assay

Cell lines were plated in 96-well plates at a density of 2×10^3 cells and after 24 h treated with AG 1478. We used the Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 72h following treatment according to the manufacturer's instructions. Cells were exposed overnight (16h) to the solution containing the β -galactosidase substrate, X-Gal. Images were obtained in a bright-field microscope and later analyzed using the cell counter plugin on ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

Western Blot

Cells were collected and lysed 72 h after AG 1478 treatment with a RIPA solution (Tris Buffer 50mM (pH 8.0), NaCl 150mM, SDS 0.1%, Triton X-100 1%, Sodium Deoxycholate (SDOC) 1%, EDTA 1mM) and quantified using Bradford protein assay (Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A total of 20 μ g of protein was separated by SDS-PAGE and electroblotted to PVDF membranes. The membranes were blocked with 3% bovine serum albumin in 1X TTBS for 40 min and incubated overnight at 4°C with primary antibodies against p-AKT ser473(1:750, Cell Signalling), AKT(1:750, Cell Signalling), p-ERK (1:500, Santa Cruz), ERK (1:300, Santa Cruz), Cyclin D1 (1:1000, Cell Signalling), p53 (1:500 Santa Cruz), BDNF (1:250, Santa Cruz) followed by incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:2000; Sigma Aldrich) for 2 h at 4 °C. Chemoluminescence was detected using ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Thermo Scientific, USA) and analyzed using ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). β -actin was used as an endogenous control, and the band density was analyzed using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Specific inhibitors of Tyrosine Kinase Receptor pathway

Cells were seeded at a density of 3×10^4 cells/ well in 24-well plates (BD Biosciences, USA). After 24 h, lineages were treated with chosen concentrations of LY294002 (10 μ M) and U0126(10 μ M), alone or in combination with AG1478 (10 μ M). The

medium was collected 72 h after treatments; cells were detached with trypsin 0% EDTA and counted using a hemocytometer.

Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. All data are expressed as percentage mean \pm standard deviation (SD) and were analyzed using One-way ANOVA followed by Tukey or Dunn or Bonferroni post hoc tests. Values of $p < 0.05$ were considered significantly different.

Results

Treatments with EGF increases proliferation and clonogenicity in ES cells

The ES cell lines were exposed to different concentrations of EGF (0,01 μ M, 0,1 μ M and 1 μ M) for 72h and based on the cell count by trypan blue exclusion (Figure 1) and clonogenic assay results (Figure 2), we observed a statistically significant increase in the proliferation rate. SK-ES-1(A), RD-ES(B).

Fig. 1 and 2 should be inserted here

Treatments with AG1478 (Tyrphostin) decrease proliferation and clonogenicity in ES cells

Exposure of ES cell lines to EGFR phosphorylation inhibitor, AG1478, in doses of 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M and 40 μ M for 72h resulted in IC50 value of 12,8 μ M and 9,8 μ M SK-ES-1 (Figure 3A and 4A) and RD -ES (Figure 3B and 4B), respectively, resulting in a decrease in viable cell number and viability 40 μ M. Furthermore, we observed a reduction in size (colony area) and number of colonies (intensity area) in clonogenic assay (Figure 4).

Fig. 3 and 4 should be inserted here

AG1478 induces growth arrest, increase percentage of cells in sub-G1 and reduce poliploidy population

Alterations in the percentages population of SK-ES-1 (A) e RD-ES (B) lines at all stages of the cell cycle, except S, were observed after exposure of lineages for 48 hours in AG1478 doses ranging from 5 to 40 μ M (Figure 5). A significant effect was observed in relation to an arrest in G1, increased sub-G1 population and decrease of polyploidy.

Fig. 5 should be inserted here

AG1478 increase senescence population in ES lines

Evidences of senescence induction were evaluated (Figure 6) from colorimetric assay after 72h exposure of ES lineages (SK-ES-1 (A) RD-ES(B)) to AG1478 (5 μ M, 10 μ M and 20 μ M) by colorimetric assay according to the manufacturer's instructions. Statistical differences were observed in lineages as the percentage of senescent cells compared to the control at all doses.

Fig. 6 should be inserted here

Western Blot Analysis of viability, proliferation and neurotrophins associated pathways after exposure to AG1478.

Proteins involved in signaling pathways associated with proliferation mechanisms triggered by EGFR and related with neurotrophins were evaluated by Western Blot, including ERK, p-ERK, Akt, p-AKT, CyclinD1, p53 and BDNF. We analyzed the protein content of these targets in SK-ES-1 cells (Figure 7A) and RD-ES (Figure 7B) exposed to AG1478 for 72 hours at doses of 5 μ M, 10 μ M and 20 μ M. In SK-ES-1, the treatment with this inhibitor in dosages of 10 μ M and 20 μ M led to a significant decrease in cyclin D1, a marker of progression cycle, and p-AKT, proliferation protein related, whereas the levels of AKT, ERK, p-ERK and BDNF were significantly altered only at dose of 20 μ M. In contrast, BDNF increased in treatment with this inhibitor at

5 μ M. In RD-ES, we had the similar profile results, however with statistical results to dose of 20 μ M for major proteins, except BDNF.

Fig. 7 should be inserted here

Effects of AG1478 and pharmacological inhibitors in ES lines

ERK and AKT signaling influences were evaluated by exposure of ES lines to pharmacological inhibitors alone and in combination with AG1478. SK-ES-1 (8A) and RD-ES (8A) cell were treated with IC 50 doses of EGFR inhibitor and/or 10 μ M of LY294002 (anti-PI3K) and/or U0126 (anti-MEK). Alone, inhibition of PI3K only affected the number of viable cells in the RD-ES line, and the same was observed with inhibition of MEK in SK-ES-1 cells (Figure 8). The combination of AG1478 with anti-MEK on SK-ES-1 cells resulted in an increased effect when compared to U0126 alone. Regarding the RD-ES cells similar effect was seen when treated with AG1478 and LY294002 or AG1478 and U0126.

Fig. 8 should be inserted here

Discussion

Growth factors modulate normal cellular proliferation and differentiation and are involved in cancer development and progression. Our results showed that modulation of EGF/EGFR system can affect a set of tumorigenesis processes in ES. Although a previously published study employed a similar method of inhibiting phosphorylation of EGFR in ES using Gefitinib [34], this is the first study showing a clear interference in the ERK and AKT signaling pathways and altered protein levels of p53 and cyclin D1, as well as modulation of BDNF/TrkB system. These findings suggest a crosstalk between growth factor pathways. Recently, Bai and colleagues (2016) exposed mesenchymal stem cells from healthy donors (MSCHD) to

stimulation and inhibition of EGF/EGFR system with the same methodology used here and data presented by them confirm the potential targets modulated by this system [35]. This report becomes important because there is some evidence suggesting that MSCHD cells have very similar profile to tumor stem cells of Ewing's sarcoma [36]. Our results showed that exposition to EGF induced acute and chronic cell proliferation in cultured ES cells, corroborating results found in other tumor types [11,24]. Previous study on glioma lines confirms the results with the dose of 100 ng/ml, showing, in addition, and another experiment with EGFR inhibitor that results in reversibility of the antiproliferative effect [29]. Our results with the clonogenic assay, in colony area, has a statistically significant late effect only for dose of 1000 ng/ml, however, in 100ng/ml is still observed a tendency and hence an influence of exposure to EGF on lineage growth. Other studies in adult cancers are in agreement with our results, including strengthening modulations in signaling pathways observed when EGFR is inhibited, especially inhibition of p-ERK and p-AKT [37-40].

In our study we found both the reduction of phosphorylated as the constituent proteins at a dose of 20 μ M of AG1478. The increase in p53 levels indicated a possible apoptosis induction at a dose of 5 μ M and /or 20 μ M, depending of the cell lines, and this result was also detected in human breast cancer cells [16]. Other outstanding reduction was found in polyploidy population of the two lineages, an important result when we relate this group of cells to a profile of tumor resistance [41]. The crosstalking with BDNF/TrkB system was questioned because the inhibition of EGFR phosphorylation at dose of 5 μ M is associated with an increase in protein levels of BDNF in SK lineage and a slight increase considering the standard deviation in RD-ES cells. Furthermore, exposure to doses of 10 μ M and 20 μ M in which the effects in proliferation and senescence are most evident resulted in a significant decrease in same protein. This same crosstalking was observed in lung and ovary tumors, as well as in studies performed by our group with colon cancer [24-25, 42]. Moreover, it is suggested in the literature a transactivation of Trk receptors by EGF in physiological processes such as the regulation of cortical neurons migration [23]. Reducing the protein levels of BDNF/TrkB system could have some clinical relevance since neurotrophin signaling through TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells, which may be related to metastasis and resistance processes [43]. ERK and AKT signaling influences were evaluated by exposure of ES lines to pharmacological inhibitors alone and in combination with AG1478. Presented results suggesting that there may be a synergistic effect when combined U0126 with AG1478 is in RD-ES, reinforcing

crosstalking between signaling pathways and possible additive effect on SK-ES-1 line.

Regarding to EGFR, many therapeutic escape mechanisms are already described, including mutation in the extracellular site or the presence of the receptor on the nuclear membrane. The use of a classified inhibitor as small molecule can circumvent some of them [44]. The specificity of these molecules has been studied by Levitzky and colleagues (1995), who compared 10 classes of inhibitors, being the more specific AG1478 [45]. This specificity occurs directly not binding to other members of the same family of EGFR, however its effect can be amplified to the extent that the HER family receptors can form heterodimers. There are also literature data indicating a certain preference of this inhibitor by truncated receptors, i.e. receptors presenting nonsense mutations in their coding genes and make them more resistant to currently used therapies.

Conclusion

It is suggested that exposure of the cell lines SK-ES-1 and RD-ES to EGF / EGFR system modulation significantly impact the viability, proliferation, cell cycle and senescence phenomenon. It is suggested, therefore, a large influence of EGFR dependent pathways in tumorigenesis Ewing's sarcoma.

Acknowledgements

This research was supported by the the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM); the Children's Cancer Institute (ICI); PRONON/Ministry of Health, Brazil (number 25000.162.034/2014-21 to C.B.F); the Rafael Koff Acordi Research Fund; and the HCPA institutional research fund (FIPE/HCPA).

References

1. N.J. Balamuth, R.B. Womer, Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol.* 11, 184-192 (2010)

2. H. Kovar, Progress in the molecular biology of Ewing tumors. *Sarcoma* 2, 3-17 (1998)
3. N. Riggi, I. Stamenkovic, The biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett.* 254, 1-10 (2007)
4. D.S. Salomon, R. Brandt, F. Ciardiello, N. Normanno, Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 19, 183-232 (1995)
5. N. Normanno, A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M.R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro, D.S. Salomon, Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366, 2-16 (2006)
6. I.D. Campbell, P. Bork, Epidermal growth factor-like modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 385-392 (1993)
7. Rico-Varela, Jennifer, Tanya Singh, Sean McCutcheon, and Maribel Vazquez. "EGF as a New Therapeutic Target for Medulloblastoma Metastasis." *Cellular and Molecular Bioengineering* 8, no. 4; 553–65 (2015).
8. M. Jaeger, C. Nör, C.B. de Farias, A.L. Abujamra, G. Schwartzmann, A.L. Brunetto, R. Roesler, Anti-EGFR therapy combined with neuromedin B receptor blockade induces the death of DAOY medulloblastoma cells. *Child. Nerv. Syst.* 29, 2145-2150 (2013)
9. S.K. Muthuswamy, M. Gilman, J.S. Brugge, Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6845-6857 (1999)
10. A.P. Belsches-Jablonski, J.S. Biscardi, D.R. Peavy, D.A. Tice, D.A. Romney, S.J. Parsons, Src family kinases and HER2 interaction in human breast cancer cell growth and survival. *Oncogene* 20, 1465-1475 (2001)
11. E.S. Henson, S.B. Gibson, Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell. Signal.* 18, 2089-2097 (2006)
12. Y. Yarden, The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer* 37, Supplement 4(0):3 (2001)
13. C.J. Thiele, Z. Li, A.E. McKee, On Trk-the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin. Cancer Res.* 15, 5962-5967 (2009)

14. K. Matsumoto, R.K. Wada, J.M. Yamashiro, D.R. Kaplan, C.J. Thiele, Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 55, 1798-1806 (1995)
15. Yu Y, Zhang S, Wang X, Yang Z, Ou G . Overexpression of TrkB promotes the progression of colon cancer. *APMIS* 118: 188–195(2010).
16. Y. Zhang, Y. Fujiwara, Y. Doki, S. Takiguchi, T. Yasuda, H. Miyata, M. Yamazaki, C.Y. Ngan, H. Yamamoto, Q. Ma, M. Moden, Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. *Oncology* 75, 17-26(2008)
17. K. Okamura, T. Harada, S. Wang, K. Ijichi, K. Furuyama, T. Koga, T. Okamoto, K. Takayama, T. Yano, Y. Nakanishi, Expression of TrkB and BDNF is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 78, 100-106 (2012)
18. C.T. Lam, Z.F. Yang, C.K. Lau, K.H. Tam, S.T. Fan, R.T.P. Poon, Brain-derived neurotrophic factor promotes tumorigenesis via induction of neovascularization: implication in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 17, 3123-3133 (2011)
19. K. Ketterer, S. Rao, H. Friess, J. Weiss, M.W. Büchler, M. Korc, Reverse transcriptions-PCR analysis of laser-captured cells points to potential paracrine and autocrine actions of neurotrophins in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 9, 5127-5136 (2003)
20. C. Lai, M. Wu, P. Li, C. Shi, C. Tian, J. Zang, Solution NMR characterization of Sgf73(1-104) indicates that Zn ion is required to stabilize zinc finger motif. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 397, 436-440 (2010)
21. A.K. Satoh, H. Xia, L. Yan, C.H. Liu, R.C. Hardie, D.F. Ready, Arrestin translocation is stoichiometric to rhodopsin isomerization and accelerated by phototransduction in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 67, 997-1008 (2010)
22. R.N. Pearse, S.L. Swendeman, Y. Li, D. Rafili, B.L. Hempstead, A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor cell survival. *Blood*, 1, 4429-4436 (2005)
23. D. Puehringer, N. Orel, P. Lüningschrör, N. Subramanian, T. Herrmann, M.V. Chao, and M. Sendtner, EGF transactivation of Trk receptors regulates the migration of newborn cortical neurons." *Nat. Neurosci.* 16, 407–15 (2013)

24. L. Qiu, C. Zhou, Y. Sun, W. Di, E. Scheffler, S. Healey, N. Kouttab, W. Chu, Y. Wan, Crosstalk between EGFR and TrkB enhances ovarian cancer cell migration and proliferation. *Int. J. Oncol.* 29,1003-1011 (2006)
25. R. Götz, M. Sendtner, Cooperation of tyrosine kinase receptor TrkB and epidermal growth factor receptor signaling enhances migration and dispersal of lung tumor cells". *PLoS ONE* 9(6): e100944. (2014)
26. Han, Yuchun, Cornelio Gacusana Caday, Anil Nanda, Webster K Cavenee, and H-j Su Huang. "Tyrphostin AG 1478 Preferentially Inhibits Human Glioma Cells Expressing Truncated Rather than Wild-Type Epidermal Growth Factor Receptors" *Cancer Research* 56, 3859-3861, September 1 (1996).
27. Shelton, John G., Linda S. Steelman, Steven L. Abrams, Edmund R. White, Shaw M. Akula, Richard A. Franklin, Fred E. Bertrand, Martin McMahon, and James A. McCubrey. "Conditional EGFR Promotes Cell Cycle Progression and Prevention of Apoptosis in the Absence of Autocrine Cytokines." *Cell Cycle* 4, no. 6: 822–30 (2005).
28. Goldman, C. K., J. Kim, W. L. Wong, V. King, T. Brock, and G. Y. Gillespie. "Epidermal Growth Factor Stimulates Vascular Endothelial Growth Factor Production by Human Malignant Glioma Cells: A Model of Glioblastoma Multiforme Pathophysiology." *Molecular Biology of the Cell* 4 (1): 121–33. (1993).
29. B. Li, C.M. Chang, M. Yuan, W.G. McKenna, H.K. Shu, Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas." *Cancer Res* 63, 7443–7450 (2003)
30. Takai, N., Ueda, T., Nishida, M., Nasu, K., Narahara, H."Synergistic anti-neoplastic effect of AG1478 in combination with cisplatin or paclitaxel on human endometrial and ovarian cancer cells". *Molecular Medicine Reports* 3, no. 3 :479-484. (2010)
31. Pickhard AC, Margraf J, Knopf A, et al. Inhibition of radiation induced migration of human head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways. *BMC Cancer*;11:388. (2011)
32. Dos Santos, M. P., de Farias, C. B., Roesler, R., Brunetto, A. L., Abujamra, A. L."In vitro antitumor effect of sodium butyrate and zoledronic acid combined with traditional chemotherapeutic drugs: a paradigm of synergistic molecular targeting in the treatment of Ewing sarcoma". *Oncology Reports* 31, no. 2 : 955-968 (2014).

33. Guzmán C, Bagga M, Kaur A, Westermarck J, Abankwa D. ColonyArea: An ImageJ Plugin to Automatically Quantify Colony Formation in Clonogenic Assays. Rota R, ed. PLoS ONE. (2014).
34. M.K. Andersson, P. Åman, Proliferation of Ewing sarcoma cell lines Is suppressed by the receptor tyrosine kinase inhibitors gefitinib and vandetanib." *Cancer Cell International* 8 (1): 1. (2008).
35. Bai, Tingting, Feilin Liu, Fei Zou, Guifang Zhao, Yixu Jiang, Jiahong Shi, Deshun Hao, et al. "EGF Induces Proliferation of HF-MSCs through EGFR-Mediated Activation of ERK and AKT Signaling Pathways Associated with Upregulation of Cyclin D1 and Downregulation of p16." *Stem Cells and Development*, 2016. doi:10.1089/scd.2016.0234.
36. Amaral, A. T., M. C. Manara, D. Berghuis, J. L. Ordonez, M. Biscuola, M. A. Lopez-Garcia, D. Osuna, E. Lucarelli, F. Alviano, A. Lankester, K. Scotlandi and E. de Alava "Characterization of human mesenchymal stem cells from ewing sarcoma patients. Pathogenetic implications." *PLoS One* 9(2): e85814 (2014).
37. X.F. Zhu, Z.C. Liu, B.F. Xie, Z.M. Li, G.K. Feng, D. Yang, Y.X. Zeng, EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits cell proliferation and arrests cell cycle in nasopharyngeal. *Cancer Lett.* 169, 27-32 (2001)
38. L. Caja, P. Sancho, E. Bertran, C. Ortiz, J.S. Campbell, N. Fausto, I. Fabregat, The tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits proliferation and induces death of liver tumor cells through EGF receptor-dependent and independent mechanisms. *Biochemical Pharmacology* 82, 1583 – 1592 (2011)
39. G. Partik, K. Hochegger, K., M. Schörkhuber, B. Marian, Inhibition of epidermal-growth-factor-receptor-dependent signalling by tyrosine kinase inhibitors AG25 and AG 1478 blocks growth and induces apoptosis in colorectal tumor cells in vitro. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 125: 379 (1999).
40. E. Carrasco-García, M. Saceda, S. Grasso, L. Rocamora-Reverte, M. Conde, A. Gómez-Martínez, P. García-Morales, J.A. Ferragut, I. Martínez-Lacaci, Small tyrosine kinase inhibitors interrupt EGFR signaling by interacting with erbB3 and erbB4 in glioblastoma cell lines. *Experimental Cell Research* 317, 1476-1489 (2011)
41. J. Coward, A. Harding, Size does matter: why polyploid tumor cells are critical drug targets in the war on cancer 4. *front onco.* (2014).

42. C.B. de Farias, T.E. Heinen, R.P. dos Santos, A.L. Abujamra, G. Schwartzmann, R. Roesler, BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 328-332 (2012)
43. Lawn, Samuel, Niveditha Krishna, Alexandra Pisklakova, Xiaotao Qu, David A. Fenstermacher, Michelle Fournier, Frank D. Vrionis, et al. "Neurotrophin Signaling via TrkB and TrkC Receptors Promotes the Growth of Brain Tumor-Initiating Cells." *Journal of Biological Chemistry* 290, no. 6: 3814–24 (2015).
44. Brand, T. M., Iida, M., Li, C., & Wheeler, D. L. The Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Network and its Role in Cancer. *Discovery Medicine*, 12(66), 419–432 (2011).
45. Levitzki, Alexander, and Aviv Gazit. "Tyrosine Kinase Inhibition : An Approach to Drug Development." *Science* 267, no. 16 (1995): 1782–88. doi:10.2307/2886333.

Legends for Figures

Figures 1 and 2. Treatments with EGF increases proliferation and clonogenicity in ES cells. (A) SK-ES-1 and (B) RD-ES cells were treated with the different EGF doses for 72 h and proliferation was assessed in a trypan blue and clonogenic assay as described in Materials and Methods. In this experiment was Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) ; $N=3$ independent experiments; * $p < 0,05$ and ** $p < 0.01$; compared to control cells using one-way ANOVA and Tukey post-hoc test

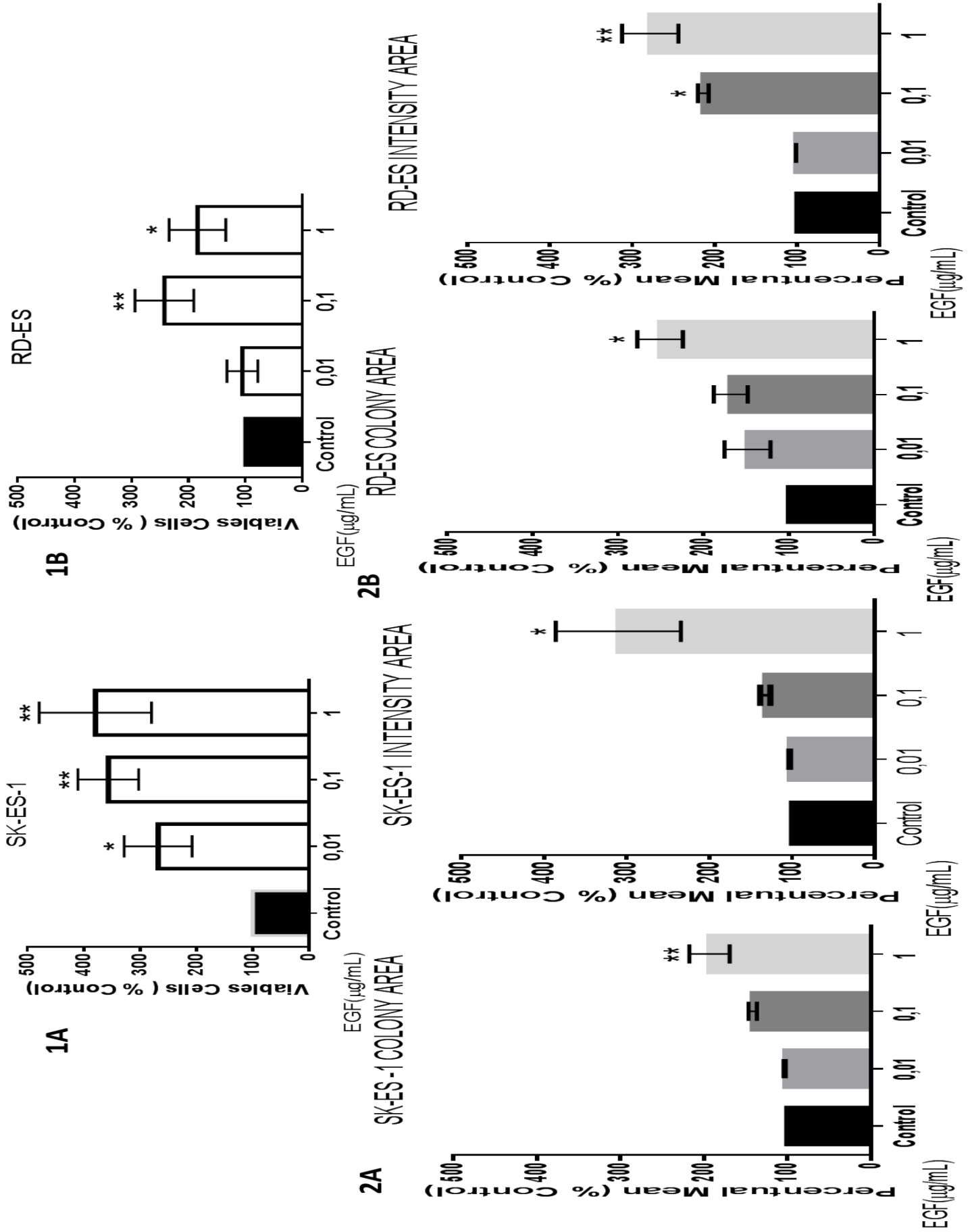
Figures 3 and 4. Treatments with AG1478 (Tyrphostin) decrease proliferation and clonogenicity in ES cells(percentage mean of viable cells and viability curve). SK-ES-1 **(A)** and RD-ES **(B)** cells were treated with the different AG1478 doses for 72 h and proliferation was assessed in a trypan blue and clonogenic assay as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) ; $N=3$ independent experiments; * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; and **** $p < 0.0001$ compared to control cells using one-way ANOVA and Tukey post-hoc test.

Figure 5. AG1478 induces growth arrest, increase percentage of cells in sub-G1 and reduce poliploidy population. Cell cycle dynamics in human SK-ES-1**(A)** and RD-ES ES **(B)** cells treated with AG1478 48 hs, as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentage mean of cells in each phase of the cell cycle; $N=3$ independent experiments; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; and **** $p < 0.0001$ compared to control cells, using one-way ANOVA and Tukey post-hoc test.

Figure 6. AG1478 increase senescence population in ES lines. Treatment of SK-ES-1**(A)** and RD-ES**(B)** with AG1478 for 72hs in different doses increases significantly the percentage of senescent cells compared to control cells. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), based on cell count using ImageJ and one-way ANOVA and Tukey post-hoc test. $N = 3$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ and **** $p < 0.0001$ compared to control cells, using one-way ANOVA and Tukey post-hoc test.

Figure 7. Western Blot Analysis of viability, proliferation and neurotrophins associated pathways after exposure to AG1478. Protein content of ERK, p-ERK, AKT, p-AKT, p53, Cyclin D1 and BDNF in human ES cells (SK-ES-1 (A), RD-ES (B)) treated with AG1478 at doses 5 μ M, 10 μ M and 20 μ M for 72 h before Western Blot assays as described in Materials and Methods. Results were quantified with ImageJ analysis and representative bands of 3 independent experiments are shown. Bar graphs indicate mean of protein levels \pm standard deviation (SD). For statistics analysis, we used one-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test considering * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0,0001$ compared to controls and β -actin was used as an endogenous control. Protein levels of AKT and p-AKT in the RD-ES line were not subjected to statistical analysis.

Figure 8. Effects of AG1478 and pharmacological inhibitors in ES lines. ERK and AKT signaling influences were evaluated by exposure of ES lines to inhibitors pharmacológicos alone and in combination with AG1478. SK-ES-1 (8A) and RD-ES (8B) cell were treated with IC 50 doses of EGFR inhibitor and/or 10 μ M of LY294002 (anti-PI3K) and/or U0126 (anti-MEK). For statistics analysis, we used one-way ANOVA and Tukey post-hoc test considering * $p < 0,05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0,0001$ compared to control and combinations were compared with single treatments (# compared with AG 1478 alone; \$ compared with inhibitor pathway alone).



Figures 3 and 4

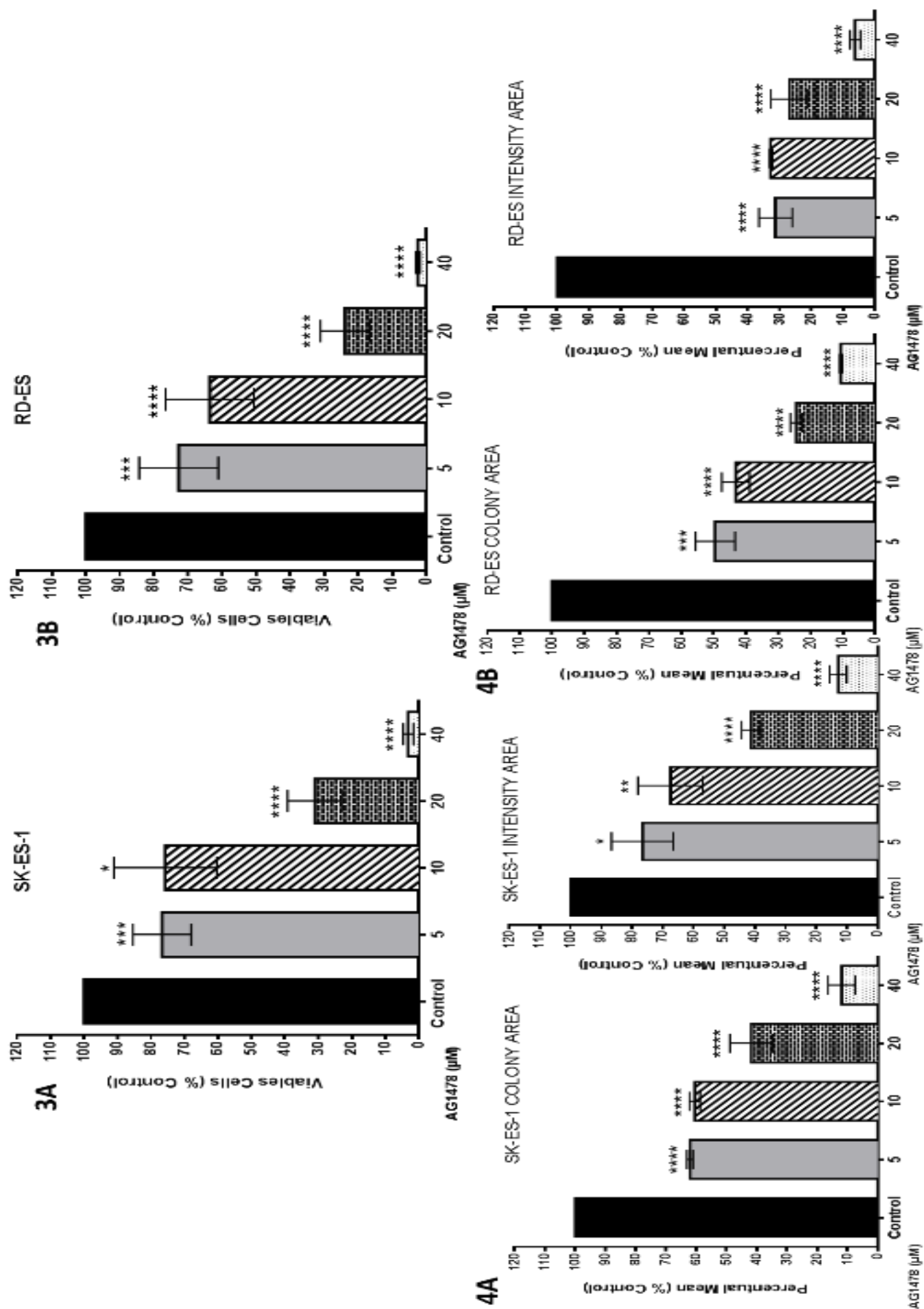


Figure 5

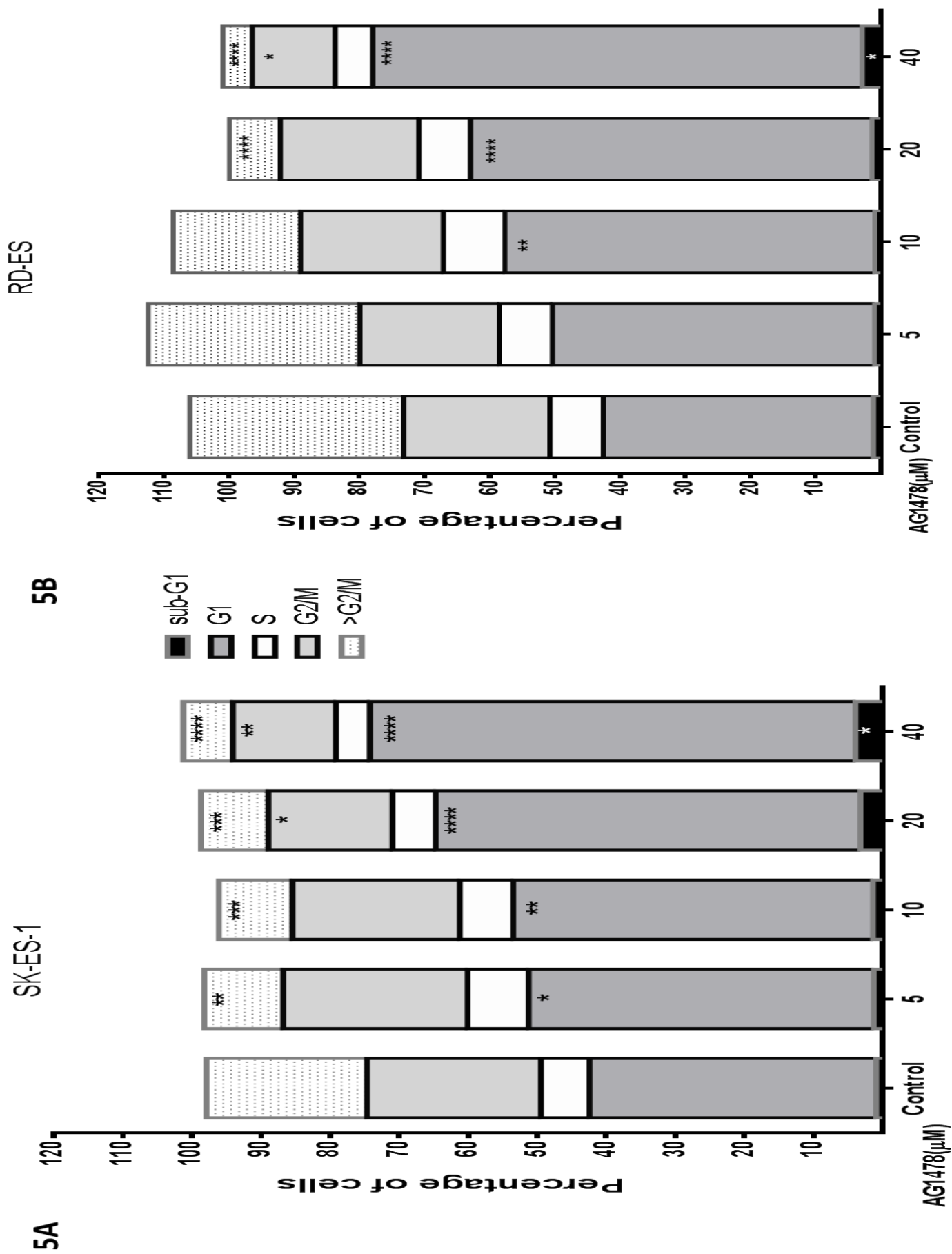


Figure 6

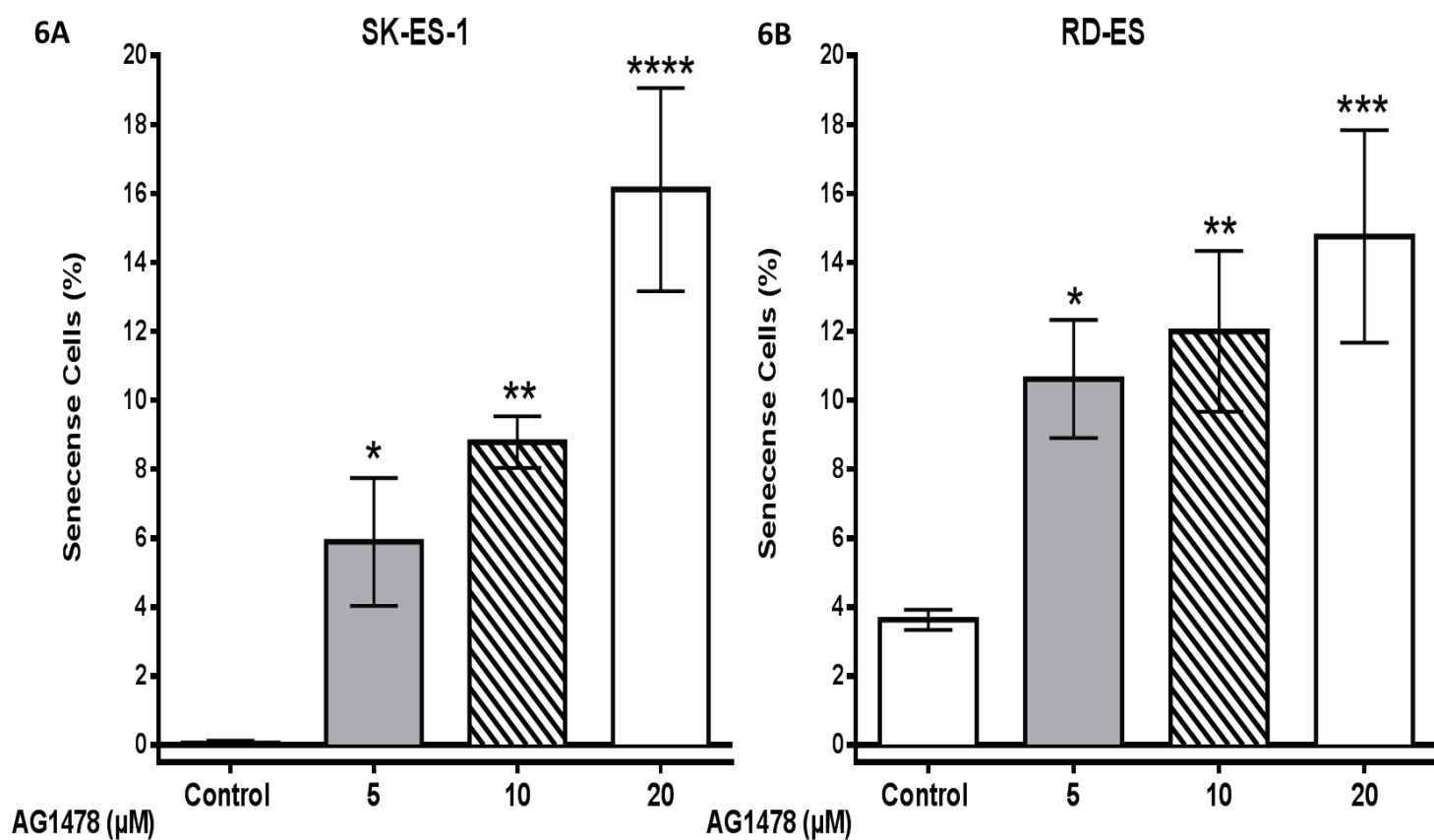
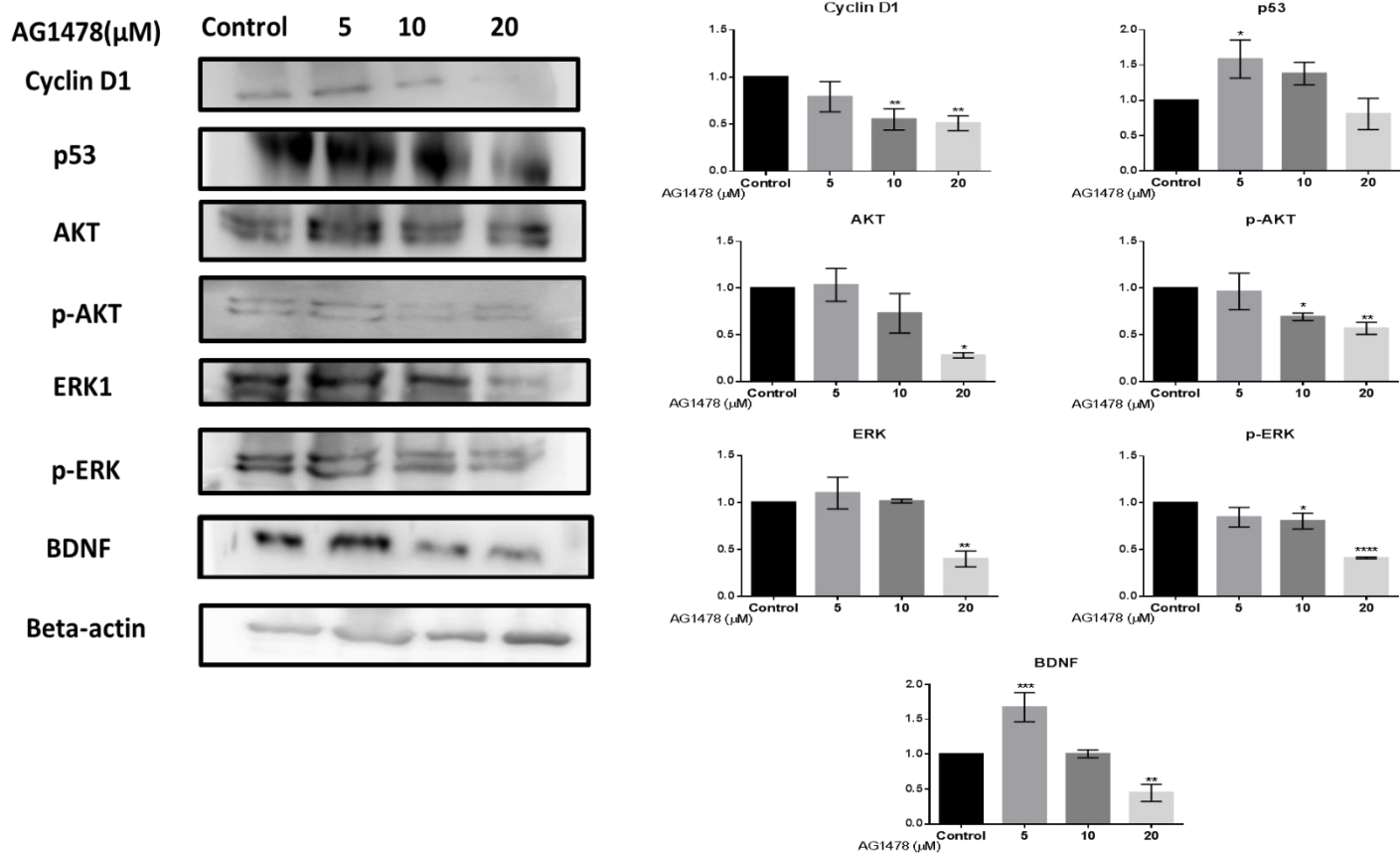


Figure 7



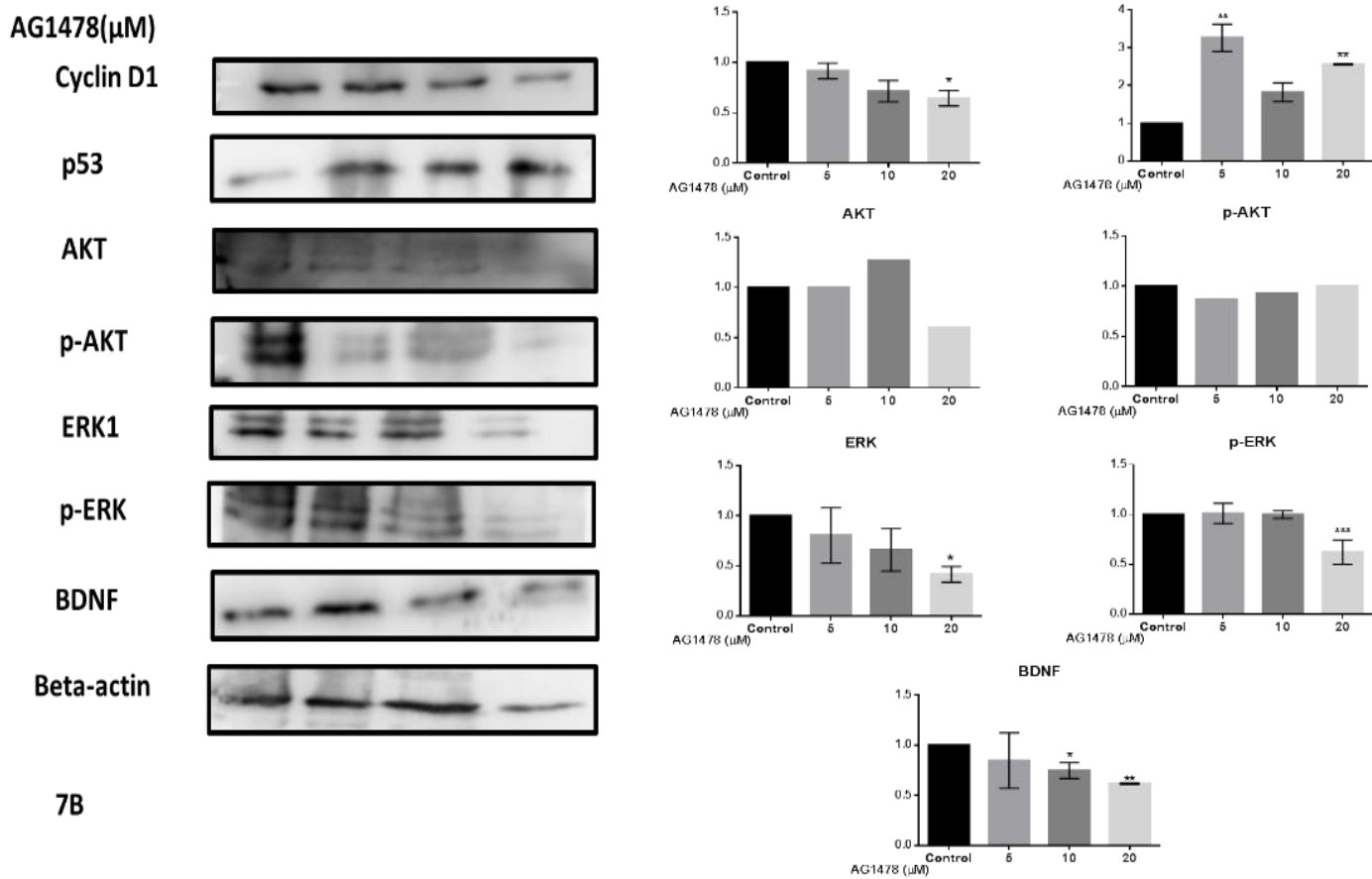
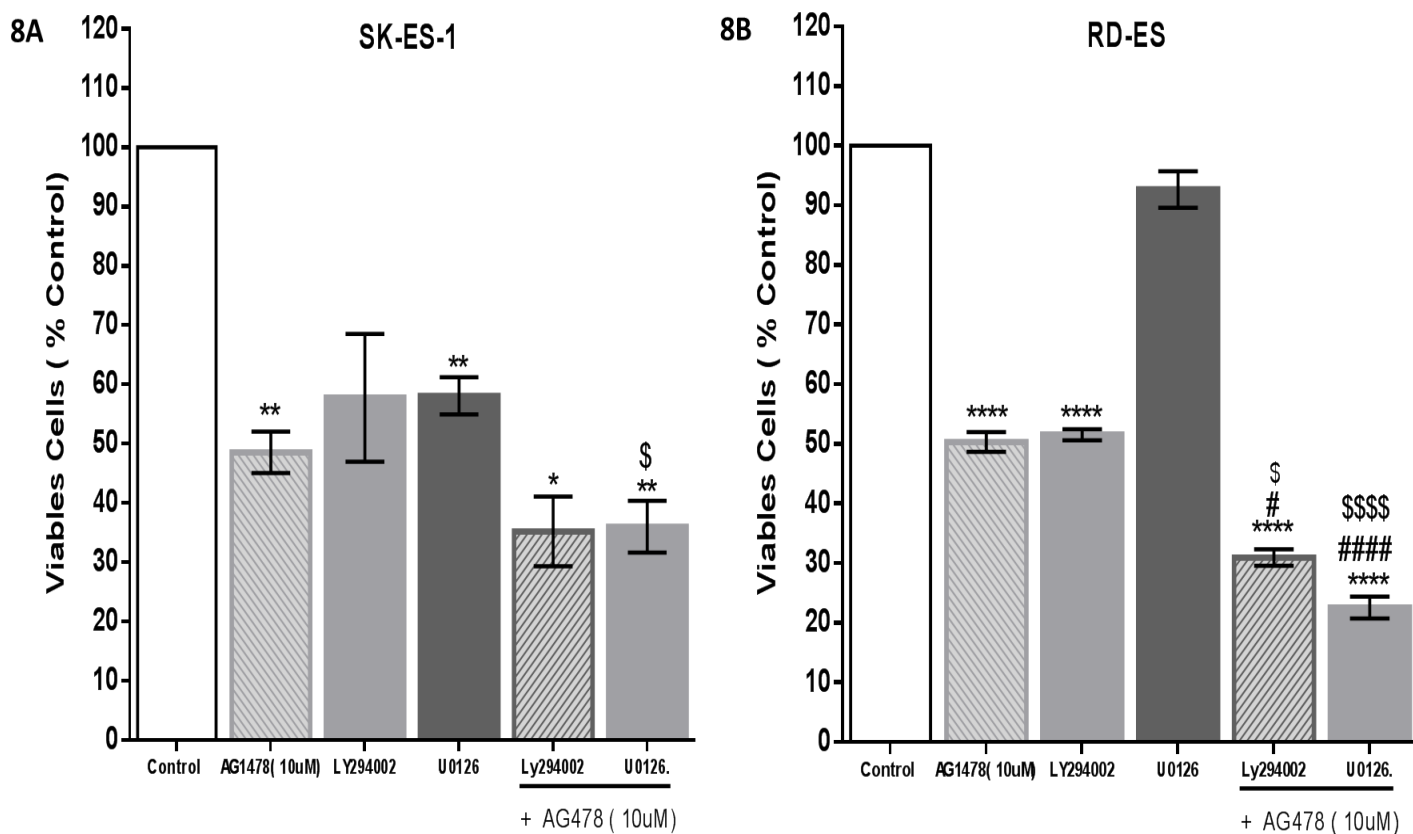


Figure 8



CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou que a sinalização EGF/EGFR está amplamente envolvida na manutenção do status tumoral em Sarcoma de Ewing. E este processo envolve vias já descritas tanto em processos fisiológicos como patológicos, sendo elas PI3K/AKT e MEK/ERK, além de proteínas como ciclina D1, marcador de progressão de ciclo celular, e p53, envolvida na apoptose. Tanto na estimulação das células com EGF, quanto na inibição observou-se efeitos significativos na proliferação em período recente e tardio ao tratamento. Este decréscimo no número de células viáveis, quando da exposição ao AG1478 por 72 horas, é confirmado pelos resultados de ciclo celular, o qual evidencia uma parada na fase G1, aumento da população G0/ sub-G1, diminuição da percentagem de células em G2 e poliploides. A partir da sugestão de parada de ciclo, questionamos quanto a indução de senescência, a qual mostrou-se positiva nas duas linhagens para as três doses de tratamento. Este resultado é relevante na medida em que podemos relacioná-lo ao aumento de expressão de genes supressores tumorais. Quanto às vias estudadas observamos resultados mais proeminentes nas células SK-ES-1; uma razão para isso seria diferença no tempo de ciclagem desta para o RD-ES, entretanto a dose de 20 μ M mostrou-se efetiva para todos os alvos estudados nas duas linhagens, ressaltando a diminuição de BDNF, o que nos sugere *crosstalking* entre EGF/EGFR e BDNF/TrkB. Devido a esta cooperação entre os complexos faz-se necessário um maior entendimento das vias de sinalização que compreendem a resposta tanto na ativação dos receptores quanto na inibição, objetivando não só compreender a proteômica que envolve todo o processo, mas também prováveis alvos epigenéticos que podem estar atrelados aos resultados aqui obtidos.

ANEXO

Perfil –Linhagem Celulares



Product Sheet

SK-ES-1 (ATCC® HTB-86™)

Description

Organism: *Homo sapiens*, human**Tissue:**

bone

Disease: sarcoma (anaplastic osteosarcoma or Ewing's sarcoma)**Age:** 18 years**Gender:** male**Morphology:** epithelial**Isoenzymes:**

AK-1, 1

ES-D, 1

G6PD, B

GLO-I, 2

PGM1, 1

PGM3, 1-2

DNA Profile:

Amelogenin: X,Y

CSF1PO: 11

D13S317: 8,9

D16S539: 11

D5S818: 12

D7S820: 10,11

THO1: 6,9,3

TPOX: 8

vWA: 14,17

Cytogenetic Analysis: modal number = 49; range = 44 to 51. This is a hyperdiploid human cell line with the modal chromosome number of 49 occurring in 34% of cells. However, cells with 50 chromosomes also occurred at high percentage (24%). At least 11 markers were consistently present in most cells. Among them were: der(3)t(3;12) (q21;q13); del(3) (q21); inv(1) (p36.1q21), and der(16)t(5;16) (q13;p13.3), all present in single copy per cell. At least three Y-autosome markers were detected. Single normal X chromosome was found in every cell. Normal Y chromosome was not found.



Product Sheet

RD-ES (ATCC® HTB-166™)

Description

Organism: *Homo sapiens*, human**Tissue:**

bone

Disease: Ewing's sarcoma**Age:** 19 years**Gender:** male**Morphology:** epithelial**Growth Properties:** mixed: adherent and clusters in suspension**Isoenzymes:**

AK-1, 1

ES-D, 1

G6PD, B

GLO-I, 1-2

Me-2, 1-2

PGM1, 1-2

PGM3, 1