

Agua ultrapura como componente para ensayos multiparamétricos usados en el descubrimiento de fármacos*

Sven P. Wichert, Elmar Herbig, Michael C. Wehr¹

El agua ultrapura se utiliza para diversas aplicaciones de biotecnología como el cultivo de células, procedimientos bioquímicos y técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este artículo describe el uso específico del agua ultrapura generada por el sistema de agua de laboratorio arium® pro VF, tomada como un componente esencial en los ensayos multiparamétricos basados en células. Dichos ensayos, llamados ensayos EXT, se emplean en las primeras etapas del descubrimiento de fármacos. En estos ensayos, las actividades de señalización celular son capturadas por reporteros de códigos de barras moleculares, dando como resultado la adquisición de grandes conjuntos de datos, que se obtienen utilizando secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés). En una muestra experimental se trataron propiedades de señalización diferenciales, causadas por un estímulo específico (dominio de tipo EGF) o por un estímulo amplio (PMA y suero). Las células estimuladas con dominio de tipo EGF mostraron una respuesta del gen temprano inmediato, mientras que la adición de PMA y suero causó la activación de vías de respuesta inmunitaria. La adición de lapatinib inhibió prácticamente todas las respuestas inducidas por el dominio de tipo EGF, mientras que las respuestas de PMA/suero se revirtieron solo parcialmente. En particular, el agua ultrapura fue usada con efectividad en varios pasos del proceso incluyendo, entre otras cosas, el aislamiento de reporteros de códigos de barras moleculares, su amplificación usando diferentes estrategias PCR y las ejecuciones de NGS. El agua ultrapura aplicada cumple todos los criterios para su uso en aplicaciones sensibles de biología molecular.

Otras palabras clave: Ensayos EXT, Ensayos multiparamétricos basados en células, Perfilado de la señalización celular.

1. Introducción

En la investigación biomédica y el descubrimiento de fármacos, los ensayos basados en células se combinan cada vez más con

Abstract

Ultrapure water as a component of multi-parametric assays used in drug discovery

Applications for ultrapure water are wide-spread within biotechnology, as it is used for cell culture, biochemistry, and molecular biology, such as polymerase chain reactions (PCR).

Here, the specific use of ultrapure water generated from the arium® pro VF device is described as an integral component of cell-based multi-parametric profiling assays. These assays, termed EXTassays, are used at early stages of drug discovery.

Within these assays, cellular signalling events are captured by molecularly barcoded reporters, resulting in the acquisition of large data sets, which are obtained within one measurement using Next Generation Sequencing (NGS). In a sample experimental setup, differential signalling properties were addressed, which were either caused by a specific stimulus (EGF-like domain) or a broad stimulus (PMA and serum). EGF-like domain- treated cells displayed an immediate early gene response, whereas the addition of PMA and serum caused an activation of immune response pathways. Addition of lapatinib inhibited virtually all responses induced by EGF-like domain, whereas PMA/serum-mediated responses were only partially reverted. Notably, ultrapure water was effectively used in various processing steps, which, amongst others, included the isolation of molecular barcode reporters, their amplification using various PCR strategies, and the NGS run. Taken together, the ultrapure water applied meets all the criteria to be used in sensitive applications of molecular biology.

técnicas de ensayos multiparamétricos con el fin de investigar los procesos de enfermedad altamente complejos y los efectos de los compuestos de manera más eficaz. Estos ensayos requieren la implementación de métodos basados en biología molecular y celular que utilizan agua ultrapura como base para la realización de muchas técnicas individuales, como la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, o para el cultivo de células.

*Original publicado en Pharm. Ind. 77 Nr. 5; reproducido con autorización.

¹Systasy Bioscience GmbH, Adams-Lehmann-Str. 56, 80797 Munich, Alemania - wehr@systasy.de

Los ensayos basados en células se aplican para identificar las diferencias de acciones de señalización celular causadas, por ejemplo, por la adición de un componente dado. Estas diferencias en actividad pueden estar determinadas por cambios relativos de clases definidas de moléculas informativas (por ejemplo, ARN del mensajero [mRNA], ARN micro, proteínas, etc.). Investigar los efectos de moléculas biológicamente relevantes, como compuestos químicos y anticuerpos, en actividades celulares definidas, cuesta normalmente mucho tiempo, es caro y requiere de una considerable cantidad de consumibles. Además, es importante asegurar la mayor pureza de la solución empleada, por ejemplo de agua. Por estas razones, los ensayos multiparamétricos cada vez son más importantes.

Descripción del procedimiento del ensayo

Los ensayos multiparamétricos basados en células permiten el análisis de las acciones de compuestos en muchas moléculas celulares objetivo, llamadas targets, y la creación paralelamente de perfiles de vías de señalización celular. Se requieren estos análisis exhaustivos de las actividades de señalización celular complejas para mostrar el efecto terapéutico deseado e identificar a su vez cualquier efecto secundario no deseado. Estos ensayos también pueden utilizarse para el descubrimiento de nuevos usos de fármacos aprobados en estudios llamados de reposicionamiento de medicamentos. Además, la adquisición de grandes conjuntos de datos a partir de ensayos multiparamétricos proporciona notables beneficios de coste, que pueden obtenerse, por ejemplo, utilizando la tecnología de ensayos EXT [1].

Esta tecnología se basa en reporteros de códigos de barras moleculares, permitiendo ensayos altamente paralelos. EXT significa Expressed Sequence Tag (marcador de secuencia expresada): los EXTs son pequeñas moléculas sintéticas de ARN con una secuencia codificada específicamente que tiene una longitud de 49 bp. De esta forma, la tecnología de ensayos EXT permite la adquisición de varios millones de conjuntos de datos en una sola medición de manera que las actividades de señalización celular individuales capturadas por reporteros codificados molecularmente pueden analizarse por secuenciación [1] (Figura 1a). Los ensayos de gen reportero estándar permiten mediciones de solo uno o dos puntos de datos por unidad. Por lo tanto, las soluciones basadas en la herramienta se utilizan para adquirir grandes conjuntos de datos. Por el contrario, el sistema de ensayo específico se basa en moléculas informativas, llamadas reporteros EXT, o también denominados códigos de barras EXT. Cada reportero EXT conectado constantemente a una actividad de señalización individual tiene una etiqueta molecular que permite el análisis preciso de las expresiones espaciales y temporales del reportero. Usando estos códigos de barras, muchas actividades de señalización celular diferentes pueden ser controladas simultáneamente, como la actividad de receptores y las actividades de señalización celular aguas abajo (Figura 1b).

En los ensayos multiparamétricos discutidos en este documento, la secuenciación de nueva generación (NGS) se usa como sistema de lectura para el análisis funcional y cuantitativo de varias actividades celulares. La NGS se empleó inicialmente para secuenciar genomas [2]. El alto ritmo de avance de la NGS ha dado lugar a su uso actual que involucra aspectos médicos, como los diagnósticos terapéuticos y la identificación de genes de riesgo de enfermedades. A continuación se describen las posibilidades de uso de agua ultrapura en las diversas etapas de este método polifacético.

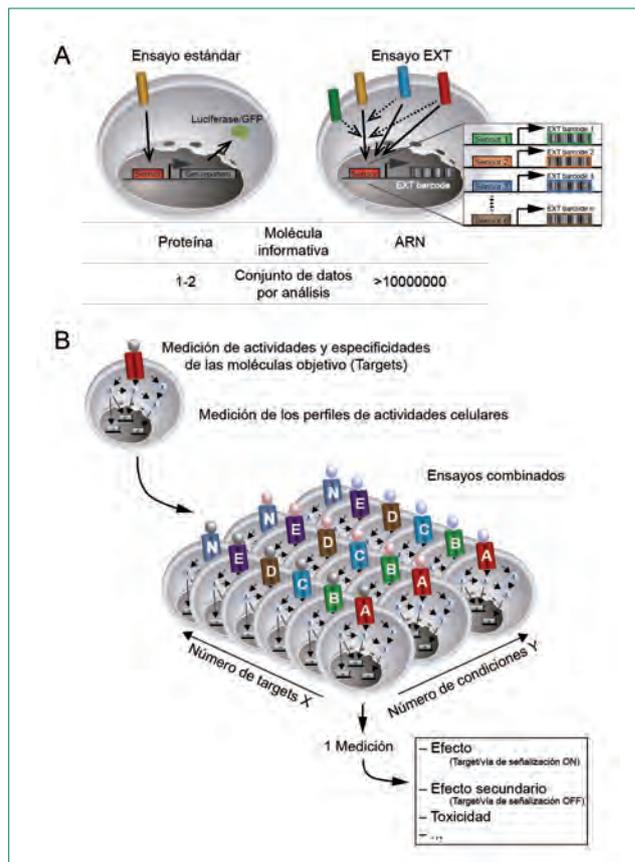


Figura 1. A) Los ensayos específicos permiten el análisis simultáneo de diferentes actividades de señalización celular en una medición. A diferencia de ensayos de gen reportero estándar, los ensayos específicos proporcionan más de 10 millones de conjuntos de datos por experimento. B) Los ensayos muestran especificidades y perfiles de actividades de señalización celular de sustancias. Los perfiles de señalización de X targets diferentes bajo Y condiciones diferentes, se capturan simultáneamente en una medición (fuente: todas las cifras proporcionadas por los autores a menos que se especifique lo contrario).

2. Materiales y métodos

Usos de agua ultrapura para ensayos multiparamétricos

El agua ultrapura desempeña un papel crítico en varios pasos dentro de un experimento usando reporteros específicos. En

nuestros estudios se usó agua ultrapura en autoclave, por ejemplo, para humidificar incubadoras de cultivo celular para asegurar una incubación de células libre de esporas y microbios. El agua ultrapura también se empleó para determinar parámetros biológicos moleculares (por ejemplo, concentraciones de ADN y ARN).

Además, el agua ultrapura se usó para preparar muestras de NGS; es decir, la purificación de reporteros EXT usando un kit de aislamiento de ARN, transcrito de forma inversa en secuencias de ADNc y la posterior ejecución de pasos de PCR necesarios para amplificar el material reportero para la secuenciación de alto rendimiento. El agua ultrapura se utilizó también en las últimas ejecuciones de NGS realizadas usando una Ion Torrent Personal Genome Machine® (secuenciador ion PGM™) suministrado por Life Technologies (Figura 4).

El agua ultrapura se produjo usando arium® pro VF (Figura 2) como se ha descrito en Nitzki y Herbig [3].

Cultivo celular

Células PC12-tet-OFF (PC12-OFF) (Clontech) fueron cultivadas en medio DMEM (concentración de glucosa de 1 g/l, de Lonza) en placas revestidas de poly-L-lisina a 37 °C en una incubadora con una atmósfera de aire humidificada por agua ultrapura que contiene 5% de CO₂. El medio fue suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 5% de suero de caballo (HS), 1% de penicilina estreptomycin y 1% de GlutaMAX (Invitrogen).

Transfección de ensayo de vectores reporteros

Se transfectaron células PC12-OFF en suspensión con vectores reporteros de ensayo. Para ello, se tripsinizaron las células, se sedimentaron y se resuspendieron en DMEM (suplementado con solo un 1% de FBS) con una densidad de 10⁶ células por ml. Los complejos de ADN-lipofectamina se prepararon con 1 µg de ADN y 4 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) en alícuotas de 100 µl de medio OptiMEM por 1,5 x 10⁶ células. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se combinó con la suspensión celular y se incubó a 37 °C durante 4 horas. Para eliminar los reactivos de transfección, las células se lavaron una vez con medio DMEM (1% de FCS). Antes del análisis, las células se cultivaron bajo condiciones idénticas. Se usaron para los ensayos 5 ng por ADN plásmido y por constructo exportador EXT. De tres a cinco constructos reporteros se clonaron con diferentes EXTs por cada elemento regulador en cis.



Figura 2. Sistema actual de agua ultrapura arium® pro VF (fuente: Sartorius Lab Instruments).

Purificación de sondas de secuencia Extracción de ARN

El ARN se purificó usando el kit Qiagen RNeasy junto con la digestión de la DNasa-I en columna de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la purificación del ARN las sondas se precipitaron en la mitad de volumen de acetato de amonio de 7,5 M (preparado usando agua ultrapura) y tres veces el volumen de etanol 100%. Para la síntesis de ADNc, se usaron 1 µg de ARN extraído, transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen) y unos 120 pmol de cebadores aleatorios nanomer. Las muestras fueron probadas para determinar la pureza del ARN y se excluyó la posible contaminación de ADN ejecutando controles que no contuvieran ninguna transcriptasa inversa (-RT).

Amplificación de productos EXT-ADNc por PCR para decodificación

Las ejecuciones de decodificación de PCR se realizaron usando ADN polimerasa HotStarTaq Plus y dNTPs (ambos suministrados por Qiagen) y agua ultrapura. Se ejecutaron 30 ciclos de 3 pasos (30 s a 95 °C, 30 s a 59 °C y 30 s a 72 °C) (Figura 3). El ADNc transcrito inverso sirvió como material de partida. Ningún ADNc se usó en el control negativo (último rastro).

Las ejecuciones de codificación de PCR se llevaron a cabo también usando ADN polimerasa HotStarTaq Plus y agua ultrapura; sin embargo, solo se ejecutaron diez ciclos de 3 pasos (pasos del ciclo: 30 s a 95 °C; 20 s a 58 °C; 20 s a 72 °C) (Figura 3). Para cada codificación de PCR, se utilizó 1 µl de una muestra de decodificación de PCR diluida a 1:10 como material de partida, no se utilizó ADNc en el control negativo. Todos los productos de PCR se visualizaron y testaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Secuenciación de acuerdo con el método semiconductor

Las moléculas informativas EXT fueron secuenciadas por NGS usando una Ion PGM™ machine (Figura 4). La tecnología de secuenciación de este aparato está basada en la detección secuencial de protones que se liberan durante el proceso de polimerización de ADN. Dependiendo de la base que se desea polimerizar (adenina, guanina, citosina o timina) en la cadena complementaria, se incorpora el correspondiente dNTP y se libera un protón que es detectado por sensores de iones [4].

Análisis de la secuencia

Se usaron herramientas individuales basadas en UNIX del kit de herramientas FastX [5] para analizar la secuenciación de datos (programa de conversión FASTQ-to-FASTA y separador de códigos de barras FASTX). La presencia e identificación de cada EXT se determinó por el análisis BLAST [6], (herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas, Basic Local Alignment Search Tool) en una biblioteca de referencia de EXTs propia,

y los EXTs expresados diferencialmente fueron identificados y cuantificados utilizando scripts R [7].

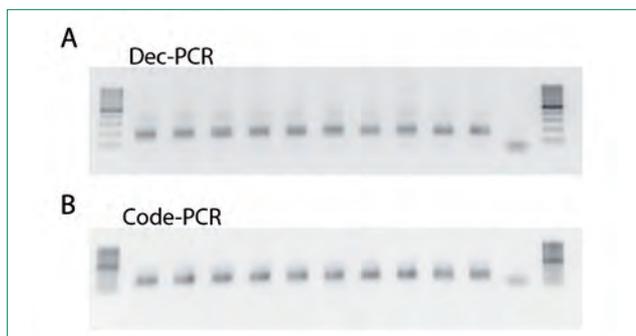


Figura 3. Control de calidad de etapas de PCR por amplificadores de EXT. Ejecución de gel de agarosa de A) Decodificación de PCR y B) Codificación de PCR. El último rastro indica el control negativo con agua ultrapura; los dímeros de los cebadores se ven aquí.

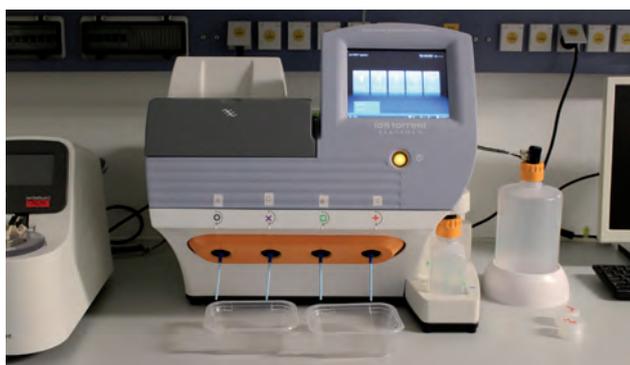


Figura 4. Ion Torrent Personal Genome Machine® (secuenciador Ion PGM™) (fuente: laboratorio de Systasy Bioscience GmbH, Munich, Alemania).

3. Resultados

La plataforma de ensayos multiparamétricos se utilizó en combinación con la NGS y con el agua ultrapura para medir un amplio número de respuestas de señalización celular aguas abajo que se dieron después de

- a) un estímulo específico,
- b) un estímulo amplio o
- c) después de la adición de un inhibidor específico.

En este caso células PC12 se transfirieron con 33 reporteros EXT diferentes, que representan actividades de 11 vías de señalización celular. Para aplicar un estímulo específico (a), el receptor ERBB4 se transfectó. Este receptor realiza un rol en muchos procesos biológicos diferentes, incluyendo el desarrollo del corazón y la diferenciación de neuronas, así como en enfermedades humanas asociadas, como cáncer o desórdenes psiquiátricos, incluyendo esquizofrenia [8, 9]. El receptor ERBB4 puede activarse por su ligando neuregulina 1, o por

el dominio soluble y biológicamente activo de neuregulina 1, dominio de tipo EGF (EGFId), y se usaron ensayos multiparamétricos previamente para supervisar las actividades del receptor ERBB4 [1, 10]. Además, la actividad de señalización ERBB4 mediada por EGFId se bloqueó específicamente por el inhibidor de quinasa lapatinib ERBB (c), que se usa también como fármaco para la terapia contra el cáncer. Un estímulo combinatorio que consta de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) se seleccionó como estímulo amplio (b).

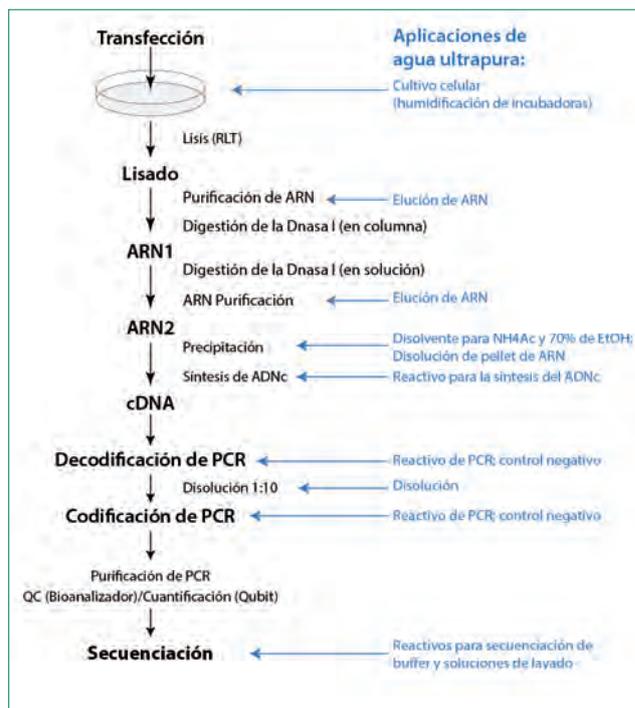


Figura 5. Flujo de trabajo para purificación de muestras de secuenciación y el uso de agua ultrapura en las diferentes etapas de trabajo.

Agua ultrapura como un componente integral de preparación de muestras para secuenciación

El agua ultrapura se usó con éxito en muchos pasos para la preparación de muestras (Figura 5). En particular, se empleó en procedimientos biológicos moleculares como ejecuciones de PCR para preparación de muestras (decodificación y codificación de PCRs, Figura 3) y para reacciones de secuenciación que se realizaron utilizando el secuenciador Ion PGM™ (Figura 6). Se requirió una alta calidad del agua con una conductividad de 18 MΩ x cm para la secuenciación con este instrumento, de acuerdo con el manual de instrucciones (ver guía del usuario [11]). Una secuenciación fiable en otras circunstancias no estaría garantizada. El agua ultrapura usada para los experimentos descritos en este estudio estaba libre de cantidades detectables de RNasa y DNasa (concentrados de RNasa y DNasa por debajo de los límites de detección de 20 ng/ml y 80 ng/ml, resp.) y se entregó con la calidad constante y estable requerida para los experimentos, con una concentración de TOC muy baja (≤ 2 ppb) y una conductividad de 18,2 MΩ x cm que se compensó a 25 °C.

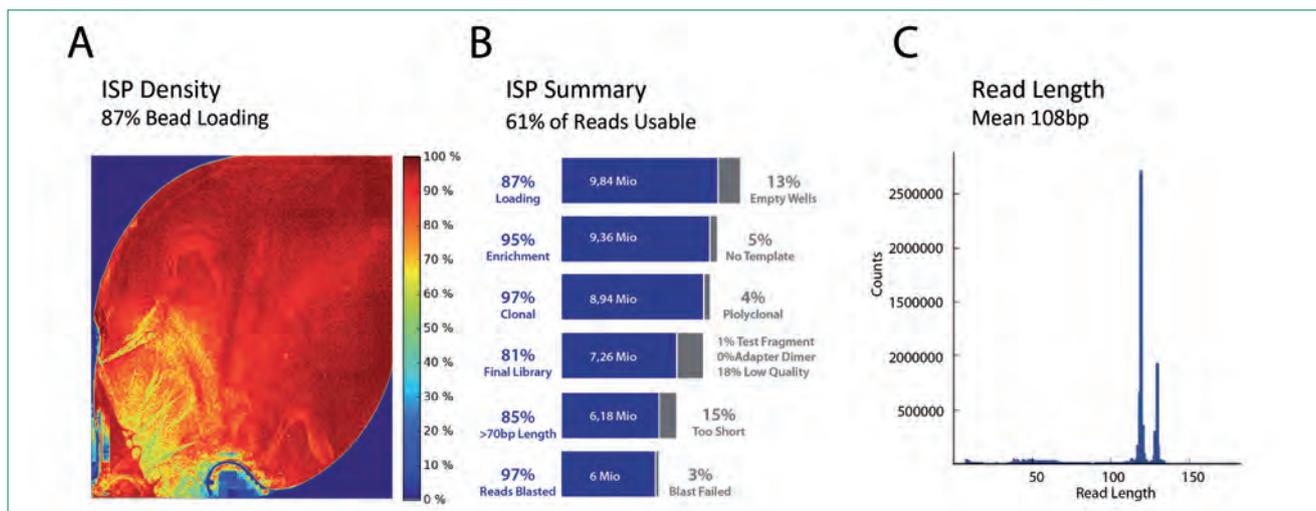


Figura 6. Control de calidad de secuenciación usando el Ion Torrent Personal Genome Machine® (secuenciador PGM™). **A)** La densidad de las partículas ion sphere (ISP) muestra la densidad de carga de las ISPs de muestra cargadas de acuerdo con una escala de colores. **B)** El resumen ISP contiene información acerca de la densidad de carga (carga 87%, 9,84 millones de pocillos), el enriquecimiento de las ISPs cargadas secuencialmente (95% enriquecimiento) antes de secuenciación, el número de ISPs clonadas (97% clonadas), la suma de todas la secuencias obtenidas (7,26 millones de reads) y el número de secuencias que puede ser usado para el análisis (6 millones de reads blasted). **C)** Información sobre la duración media de las secuencias obtenidas individualmente (duración de la lectura).

Análisis cuantitativo y cinético de actividades de señalización celular

Un análisis cuantitativo y cinético de actividades de señalización aguas abajo muestra un patrón de activación diferencial que es específico para cada estímulo particular (Figura 7). Por lo tanto, en las células tratadas con EGFId, la respuesta de los genes tempranos inmediatos (IEG) se activó considerablemente (los IEGs son genes que se activan transitoria y rápidamente en respuesta a estímulos celulares a través de las cascadas de señalización MAP quinasa; los ejemplares IEGs son EGR1, EGR2, FOS, FOSB y JUN [12]), mientras las vías de señalización relacionadas con respuestas al estrés inmunológico (IL6, IL8 and NFkB) no se activaron (Figura 7, columnas 1-4). Las células tratadas tanto con EGFId como con el inhibidor lapatinib, mostraron una inactivación casi completa de todas las vías de señalización medidas (Figura 7, columnas 5-8). En las células estimuladas con PMA/suero; las respuestas al estrés inmunológico se indujeron notablemente (Figura 7, columnas 9-12), y por el contrario solo fueron revertidas parcialmente después de tratarlas con lapatinib (Figura 7, columnas 13-16) (cf. conjunto de datos después de dos horas de la adición de lapatinib).

El agua ultrapura se usó eficazmente en los ensayos multiparamétricos y los análisis NGS posteriores. En una muestra experimental, se demostró que los efectos celulares de compuestos podían examinarse usando la plataforma de perfilado multiparamétrico de ensayos EXT supervisando las actividades de varias vías de señalización. Esto permitirá a los investigadores aprender más sobre los mecanismos deseados y no deseados de los efectos

de los compuestos dentro de las células durante las primeras etapas del desarrollo de fármacos. Además, este método de perfilado puede por tanto, disminuir sustancialmente el riesgo de fracaso y los costes en el descubrimiento de fármacos.

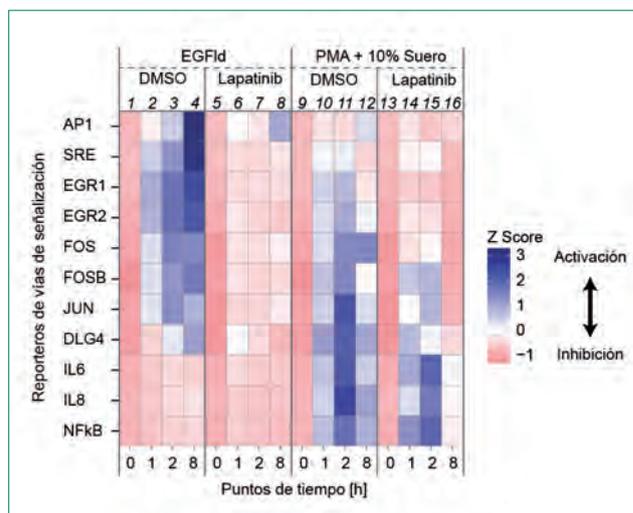


Figura 7. Análisis cuantitativo y cinético de actividades de señalización celular usando tecnología de ensayos específica (los lugares de unión para los factores de transcripción se llaman AP1, SRE y DLG4; véase texto para explicaciones de otros reporteros de vías de señalización). Actividades de señalización inducidas por el estímulo específico de dominio de tipo EGF (EGFId) o por el estímulo amplio forbol-12miristrato-13-acetato (PMA)/10% de suero, se inhiben en varios grados por el inhibidor lapatinib. Los números de columna vienen indicados en cursiva.

4. Conclusión

El agua ultrapura empleada en los experimentos referidos aquí se puede usar sin problemas para aplicaciones bioquímicas, de biología molecular y biología celular descritas anteriormente, proporcionando resultados significativos. Esta agua fue utilizada entre otras cosas, para los pasos críticos de la preparación de la muestra de NGS utilizando estrategias PCR y posteriores ejecuciones de secuenciación de alto rendimiento (Figuras 3 y 6). Usando ensayos multiparamétricos, se pudieron identificar respuestas de señalización celular fuertes, diferenciadas entre un estímulo amplio y uno específico (Figura 7).

Las reacciones de secuenciación en particular requieren altos estándares de agua ultrapura que el agua tipo 1 utilizada en estos experimentos cumple gracias a su excepcionalmente baja concentración de TOC y su calidad constante.

Además, el agua ultrapura obtenida del sistema de agua de laboratorio estaba libre de actividad nucleasa detectable - esta característica es importante ya que solo un rastro de actividad nucleasa podría interferir sustancialmente con aplicaciones sensibles en biología molecular, como las ejecuciones de PCR - y ofrece constantemente una conductividad de 18,2 MΩ x cm.

Por lo tanto, se puede realizar una secuenciación precisa con la Ion PGM™ machine en muestras preparadas con el agua ultrapura generada por el sistema de agua de laboratorio utilizado. Las secuenciaciones con la Ion PGM™ requieren una pureza del agua constante con una conductividad de 18,2 MΩ x cm. Existen datos no publicados que muestran que el agua de grado reactivo purificada con una conductividad menor de 18,2 MΩ x cm no es adecuada para aplicaciones bioquímicas y de biología molecular, como el análisis western blot y las ejecuciones de PCR. Todos los parámetros de calidad que figuran para el agua ultrapura deben cumplirse con el fin de obtener resultados reproducibles.

Por el contrario, el uso de agua purificada con parámetros de calidad pobres o ligeras impurezas dará lugar a resultados insatisfactorios. El agua del grifo debe evitarse por completo desde el inicio ya que contiene muchos elementos incluyendo sales, componentes orgánicos, nucleasas, microorganismos y moléculas de ADN sueltas. Además la calidad del agua del grifo puede variar considerablemente de región a región.

Resumen

Los ensayos multiparamétricos permiten un perfilado integral de actividades de señalización celular y son cada vez más usadas en fases tempranas del descubrimiento de fármacos para distinguir rápida y efectivamente entre efectos de compuestos deseados y no deseados. Los ensayos descritos en este estudio están basados en sensores genéticos acoplados a reporteros de

códigos de barras moleculares, y requieren que todos los materiales utilizados cumplan los más altos reporteros de calidad. Esto se demostró a modo de ejemplo para el agua ultrapura que se utilizó con éxito para diversas etapas experimentales en los ensayos multiparamétricos.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Ben Brankatschk, Sabrina Galinski, Alexandra Rupp y Elena Ciirdaeva su apoyo, contribuciones y debates estimulantes.

Bibliografía

- [1] Botvinnik, A., Wichert, S.P., Fischer T.M., Rossner, M. J. Integrated analysis of receptor activation and downstream signalling with EXTassays. *Nat. Methods*. 2010 Jan; 7(1): 74-80.
- [2] Koboldt, D.C., Steinberg, K. M., Larson, D.E., Wilson, R.K., Mardis, E.R. The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. *Cell*. 2013 Sep 26; 155(1): 27-38.
- [3] Nitzki, F., Herbig, E. *In situ* Hybridisierung - Die Bedeutung von Reinstwasser für RNA Technologien. *GIT Labor-Fachzeitschrift*. 2013 März; (57. Jahrgang, 3): 157-159 (también disponible en inglés: *In Situ Hybridization: The Importance of Ultrapure Water for RNA Technologies*).
- [4] Rusk, N. Torrents of sequence. *Nat. Meth*. 2011 Jan; 8(1): 44-44.
- [5] Patel, R. K., Jain, M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE*. 2012; 7(2): e30619.
- [6] Altschul S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E. W., Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5; 215 (3):403-410
- [7] R Core Team. *A language and environment for statistical computing*. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012.
- [8] Mei, L, Nave, K-A. Neuregulin-ERBB Signalling in the Nervous System and Neuropsychiatric Diseases. *Neuron*. 2014 Jul 2; 83(1): 27-49.
- [9] Citri, A., Yarden, Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat. Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jul; 7(7): 505-516.
- [10] Wehr, M. C., Laage, R., Bolz, U., Fischer, T. M., Grünewald, S., Scheek, S., et al. Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nat. Methods*. 2006 Dec; 3(12): 985-993.
- [11] Life Technologies. Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 [Internet]. 2013. Disponible en: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4482006>. Última actualización: 15 de abril de 2015.
- [12] Avraham, R., Yarden, Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Feb; 12(2): 104-117.