

Subproject 2: Large-Scale Functional Analysis for the Identification of microRNAs with Antitumor and Anti-metastatic Potential in Head and Neck Cancers

Principal Investigator:: *Marco Antonio Zago*

Abstract

Cancer is a worldwide public health problem. In countries with low to medium incomes, head and neck cancers (HNC) represent the fifth most common type of cancer. In the world, per year, there is approximately 17.3 new cases of HNC per 100,000 inhabitants, affecting approximately 500,000 patients (Jemal, *et al* 2011).

In Brazil, 10 to 11 thousand new cases were diagnosed in 2003, which resulted in over three thousand deaths (Ministério da Saúde, 2002). When early diagnosed, there is a good prognosis, however patients with tumors at early stages often exhibit few symptoms, which results in a delayed diagnosis and decreased survival. In these cases, the rates of local control and 5-year survival for advanced lesions spin, respectively, around 40-60% and 20-30%. Despite all the advances in the understanding of cancer and new technologies available for the treatment of HNC; different from other types of cancer, recent studies show that the five year survival rate for patients with carcinoma of the larynx has not changed since 1975, with some studies showing a worse survival (McBride, *et al* 2013). Additionally, factors related to the patient, to the tumor (site, stage, histopathological analysis) and to the treatment, are considered of limited usefulness to predict tumor's biologic behavior. In this regard, many efforts have been made to investigate the changes triggered during the process of malignant transformation, and in the search for useful markers to assist in the detection of cancers in their initial stages, to assess tumor burden, to monitor disease progression, to predict response to radiotherapy or chemotherapy, to guide patient's follow-up, and to define specific anti-tumor therapies.

With this in mind, we have carried studies focused on HNC (Oncogenomics applied Carcinomas to Head and Neck Therapy Process: 559809/2009-3; MCT/CNPq/AGRO-CT/CT-BIOTEC # 42/2009-Network GENOPROT, coordinator Prof. Wilson Araújo Silva Jr). In this study, we used microarrays to evaluate the expression of mRNAs and microRNAs in cancer tumor cells of different sub-types, as well as adjacent normal tissues. The study led to the identification of several microRNAs and mRNAs with altered expression, and potentially implicated in the pathogenesis of these neoplasms. In addition to the contribution to our understanding, these functional genomic approaches have an important role in the identification of potential therapeutic targets, since proteins encoded by aberrantly transcribed mRNAs can be targeted for the development of antibodies with immunotherapeutic potential or drugs.

MicroRNAs (miRs) are a class of small non-coding RNAs that regulate gene expression in a post-transcriptional manner, acting predominantly through the destabilization and degradation of several targeted messenger RNAs, leading to pleiotropic effects, affecting distinct biological processes (Bartel 2009, Shalgi, *et al* 2009), what confers to these molecules, a tremendous potential for the development of new therapies. Similar to small interfering RNAs (siRNAs), when synthetic double-stranded RNA molecules mimicking microRNAs (called pre-miRs) are introduced into a cell, they associate with the RNA-induced silencing complex (RISC), promoting degradation of one strand (passenger strand), while the

other is used as a guide, directing the RISC complex to different targets according to their complementarity to the target site in the mRNA (Krutzfeldt, *et al* 2006).

In another way, single stranded synthetic molecules, called anti-miRs, designed to bind with high specificity to the mature miR strand, can be used to inhibit the function of endogenous miRs, by sequestering it from the RISC complex, leading to increased translation and/or accumulation of its target transcripts (Elmen, *et al* 2008, Naguibneva, *et al* 2006, Orom, *et al* 2006).

Usually, the evaluation of the functional effects of a given microRNA (or an anti-miR) on different biological processes, is a lengthy and costly process, preventing a comprehensive systematic functional assessment of all potential target-microRNAs. The availability of genetic libraries with thousands of synthetic miRs (and corresponding anti-miRs), coupled to the evolution and automation capability of transfection methods, allowed the appearance of a group of experimental approaches, collectively called High Content Screening (HCS), a powerful tool in the functional screening of genomic libraries. This method is based on the automation of acquisition processing and computational analysis of fluorescence microscopy images, of cells arranged in plates (96 or 384 wells), allowing a qualitative and quantitative assessment of a large number of morphometric parameters and experimental conditions (Taylor 2007, Xia and Wong 2012).

Our group recently acquired a HCS equipment with the purpose of studying the role of microRNAs in the maintenance of the pluripotent state and differentiation of stem cells (as part of the recently approved CEPID-FAPESP, Process 2013/08135-2, coordinated by Prof. Marco A. Zago); allowing us to perform microRNA functional screenings in different contexts. With this in view, we propose to identify pre-miRs or anti-miRs with pro-apoptotic, anti-migratory or anti-proliferative activity, as well as microRNAs involved in the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT) or the reverse process of Mesenchymal Transition - Epithelial (MET); therefore, with therapeutic potential for the treatment of head and neck cancer.

Goals

To identify microRNAs or microRNA inhibitors with antitumor and anti-metastatic therapeutic potential for the treatment of head and neck cancers, and to investigate the potential molecular mechanisms involved.

Specific Goals

The microRNAs (or anti-miRs) with similar effects on distinct tumor cell lines, and with altered expression in tumors (as evaluated in our preliminary studies, and in additional studies to be developed as part of this initiative) will be selected. Finally, selected microRNAs will have their targets identified by large-scale approaches (through microarray analyses of pre-miR transfected cell lines, coupled to target prediction), in order to investigate the potential molecular mechanisms involved in the functional responses observed. Based on these results, we hope to further contribute to the understanding of this neoplasm and to identify functionally relevant targets with potential for the development of new therapeutic approaches. For this, we will:

1. Standardize the transfection assays of the cell lines to be used;
2. Standardize labeling with antibodies specific to proteins involved in the processes of EMT and MET;
3. Carry a microRNA Functional Screen to evaluate proliferation and cell viability using the FADU HNC lineage;
4. Carry a microRNA Functional Screen to identify modulators of microRNAs in EMT and MET process;
5. Carry secondary focused microRNA Functional Screens to evaluate the activity of selected microRNAs on cell migration;
6. Carry additional microRNA Functional Screen to evaluate proliferation and cell viability in distinct HNC cell lines (UM-SCC-14, UM-SCC-28 and UM-SCC-38);
7. Analyze the data derived from screenings using bioinformatics tools;
8. Carry a large-scale target-transcript identification of selected microRNAs; and the signaling pathways potentially involved in the functional responses observed in the biological screenings

Implementation schedule:

Specific goals	Semesters											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
Publications					2	2					2	2
PhD Conclusions					2	2					2	2

Researchers:

Amélia Góes Araújo

Danuta Sastre

Josiane Lilian dos Santos Schiavinato

Bruno Braga Sangiorgi

Ildercílio Mota de Souza Lima

Rodrigo Alexandre Panepucci

Associated Researchers:

David Livingstone Alves Figueiredo

Dimas Tadeu Covas

Miguel Mano

Rubiana Mara Mainardes

Najeh Maissar Khalil

Rui Celso Martins Mamede

References:

Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**, 215-233.

Elmen, J., et al. (2008) Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res*, **36**, 1153-1162.

INCA (2002) *Falando sobre o câncer de boca*.

Jemal, A., et al. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, **61**, 69-90.

Krutzfeldt, J., et al. (2006) Strategies to determine the biological function of microRNAs. *Nat Genet*, **38 Suppl**, S14-19.

McBride, D., et al. (2013) The mortality and cancer experience of New Zealand Vietnam war veterans: a cohort study. *BMJ Open*, **3**, e003379.

Naguibneva, I., et al. (2006) An LNA-based loss-of-function assay for micro-RNAs. *Biomed Pharmacother*, **60**, 633-638.

Orom, U.A., et al. (2006) LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene*, **372**, 137-141.

Shalgi, R., et al. (2009) Coupling transcriptional and post-transcriptional miRNA regulation in the control of cell fate. *Aging (Albany NY)*, **1**, 762-770.

Taylor, D.L. (2007) Past, present, and future of high content screening and the field of cellomics. *Methods Mol Biol*, **356**, 3-18.

Xia, X. & Wong, S.T. (2012) Concise review: a high-content screening approach to stem cell research and drug discovery. *Stem Cells*, **30**, 1800-1807.

Subprojeto 2: Análise Funcional em Larga-Escala para a Identificação de microRNAs com Potencial Antitumoral e Antimetastático no Câncer de Cabeça e Pescoço

Coordenador: *Marco Antonio Zago*

Resumo

O câncer é um evidente problema de saúde pública mundial. Em países de baixo e médio recurso, os cânceres de cabeça e pescoço (CCP) representam o quinto tipo de câncer mais comum. A taxa mundial de casos novos de Câncer de cabeça e pescoço é de aproximadamente 17,3 por ano em 100.000 habitantes, afetando cerca de 500.000 pacientes (Jemal, *et al* 2011). No Brasil, 10 a 11 mil casos novos foram diagnosticados em 2003, o que resultou em mais de três mil mortes (Ministério da Saúde, 2002). Quando diagnosticado precocemente, esse tipo de câncer apresenta bom prognóstico, porém os pacientes com tumores em estágios precoces geralmente exibem poucos sintomas, o que resulta em atraso no diagnóstico e diminuição de sobrevida. Nestes casos, os índices de controle local e sobrevida de 5 anos para as lesões avançadas giram, respectivamente, em torno de 40 a 60% e 20 a 30%. Apesar de todo o avanço no entendimento do câncer e das novas tecnologias disponíveis para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço; diferente de outros tipos de câncer, estudos recentes mostram que a sobrevida em cinco anos para o paciente com carcinoma de laringe não se alterou desde 1975, inclusive com estudos evidenciando piora na sobrevida (McBride, *et al* 2013). Adicionalmente, fatores relacionados ao paciente, ao tumor (sítio, estágio, análise histopatológica) e ao tratamento são considerados de importância limitada para prever o comportamento biológico tumoral. Neste sentido, muitos esforços tem sido colocados na investigação das alterações desencadeadas durante o processo de malignização, assim como na busca de marcadores úteis para auxiliar na detecção de cânceres em estádios iniciais, avaliar carga tumoral, monitorar a progressão da doença, determinar a resposta à radio ou quimioterapia, orientar o segmento do paciente e definir terapias anti-tumorais específicas.

Com isto em vista, vários integrantes da presente proposta, têm participado de estudos voltados ao entendimento e caracterização dos tumores de cabeça e pescoço (Oncogenômica aplicada Terapia de Carcinomas de Cabeça e Pescoço, Processo: 559809/2009-3; Edital MCT/CNPq/CT-AGRO/CT-BIOTEC nº42/2009 - Rede GENOPROT, coordenador pelo Prof. Wilson Araújo Silva Jr). Neste estudo, utilizamos microarrays para avaliar a expressão de transcritos de mRNAs e microRNAs, nas células cancerosas de diferentes sub-tipos tumorais, assim como nos tecidos normais adjacentes. O estudo nos levou a identificar vários microRNAs e mRNAs com a expressão alterada, e potencialmente implicados na patogênese destas neoplasias. Além de contribuir para o entendimento destas neoplasias, estas abordagens de genômica funcional tem um importante papel na identificação de potenciais alvos terapêuticos, uma vez que as proteínas codificadas pelos transcritos identificados podem ser alvos para o desenvolvimento de anticorpos com potencial imunoterapêutico, ou de drogas.

Os microRNAs (miRs) são uma classe de pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica de maneira pós-transcricional, atuando predominantemente através da desestabilização e degradação de RNAs mensageiros (mRNAs) alvos, levando a efeitos pleiotrópicos abrangentes e afetando processos biológicos de uma forma ampla (Bartel 2009, Shalgi, *et al* 2009), o que confere a estas moléculas um enorme potencial para o desenvolvimento de terapias. Assim como o que ocorre para os RNAs de silenciamento (siRNAs) introduzidos numa célula, moléculas sintéticas de RNA dupla-fita mimetizando microRNAs (chamados de pré-miRs), se associam com o Complexo de Indução do Silenciamento do RNA (RISC), promovendo a degradação de uma das fitas

(*passenger strand*), enquanto a outra é utilizada como guia, direcionando o complexo RISC para diferentes alvos, de acordo com a complementaridade entre a fita e o sítio alvo nos RNAs mensageiros (Kruzfeldt, *et al* 2006). De outro modo, as moléculas inibidoras de microRNAs, denominadas anti-miR, são moléculas sintéticas simples fita, desenhadas para se ligarem com alta especificidade com a fita do miR maduro endógeno (presente naturalmente na célula), cuja função deseja-se inibir. Como consequência do uso de anti-miRs, os miRs endógenos são sequestrados, inibindo suas funções e resultando no aumento da tradução e/ou no acúmulo de transcritos alvos dos miRs (Elmen, *et al* 2008, Naguibneva, *et al* 2006, Orom, *et al* 2006). Usualmente, a avaliação do efeito de um dado microRNA (ou anti-miR) sobre estes diferentes processos biológicos, é um processo demorado e custoso, impedindo uma avaliação funcional abrangente e sistemática de todos os potenciais alvos. A disponibilidade de bibliotecas compostas por milhares de miRs (e anti-miRs correspondentes) e a evolução dos métodos de transfecção, associados à capacidade de automação, permitiu que diversos métodos de triagem funcional em larga-escala (High Throughput Screening – HTS) surgissem. Dentre estes, um grupo de abordagens experimentais denominadas coletivamente High Content Screening (HCS), emergiu recentemente como uma ferramenta poderosa no screening funcional de bibliotecas genômicas. Os métodos de HCS se baseiam na automatização dos processos de aquisição de imagens de microscopia de fluorescência de células dispostas em placas (de 96 ou 384 poços), bem como, do processamento e análise computacional das imagens; permitindo a avaliação qualitativa e quantitativa de um grande número de parâmetros morfométricos e condições experimentais (Taylor 2007, Xia and Wong 2012). Recentemente, nosso grupo adquiriu um equipamento de HCS, com a finalidade de estudar o papel dos microRNAs na manutenção do estado pluripotente e na diferenciação de células tronco (como parte do recém-aprovado CEPID-FAPESP, Processo 2013/08135-2, coordenado pelo Prof. Marco A. Zago). Isto abriu portas para propormos a realização de screenings funcionais de microRNAs em diferentes contextos. Com isto em vista, propomos neste projeto, identificar microRNAs ou anti-miRs com atividade anti-proliferativa, pró-apoptótica, anti-migratória, bem como microRNAs envolvidos nos processos de Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT) ou no processo reverso da Transição Mesenquimal-Epitelial (MET); portanto, com potencial terapêutico para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço.

Objetivo Geral

Identificar microRNAs ou inibidores de microRNAs com potencial terapêutico antitumoral e antimetastático, para o tratamento dos cânceres de cabeça e pescoço, e investigar os potenciais mecanismos moleculares envolvidos.

Metas

Utilizaremos linhagens derivadas deste tumor, como modelo experimental. Dentre os microRNAs (ou anti-miRs) identificados, selecionaremos aqueles que tenham efeitos similares em linhagens adicionais, e que tenham a expressão alterada nos tumores avaliados em nossos estudos preliminares, assim como em estudos a serem desenvolvidos como parte desta iniciativa. Finalmente, os microRNAs selecionados terão seus alvos identificados por meio de abordagens em larga escala (já utilizadas por nós), de forma a investigar os potenciais mecanismos moleculares envolvidos nas respostas funcionais observadas. Com

base nestes resultados, esperamos contribuir ainda mais para o entendimento desta neoplasia e, principalmente, identificar alvos funcionalmente relevantes e com alto potencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Para isso, iremos:

- a. *Padronização do ensaios de transfecção das linhagens a serem utilizadas;*
- b. *Padronizar a marcação com anticorpos específicos a proteínas envolvidas nos processos de EMT e MET;*
- c. *Screening funcional dos microRNAs, baseado nos ensaios simultâneos de proliferação e viabilidade celular utilizando a linhagem FADU;*
- d. *Screening funcional baseado nos ensaios para identificar microRNAs moduladores dos processo de EMT e MET;*
- e. *Screenings secundários para avaliação da atividade de microRNAs selecionados, na capacidade de interferir na migração celular;*
- f. *Screening funcional dos microRNAs, baseado nos ensaios simultâneos de proliferação e viabilidade celular em linhagens adicionais (UM-SCC-14, UM-SCC-28 e UM-SCC-38);*
- g. *Análise dos dados derivados dos screenings, utilizando ferramentas de bioinformática;*
- h. *Identificação em larga escala dos transcritos alvos dos microRNAs selecionados, e as vias de sinalização potencialmente envolvidas nas respostas biológicas funcionais observadas nos screenings; por meio de abordagens utilizando microarrays de oligonucleotídeos.*

Cronograma:

Metas	1º Ano	2º Ano	3º Ano	4º Ano	5º Ano	6º Ano
<i>Sub-item a</i>						
<i>Sub-item b</i>						
<i>Sub-item c</i>						
<i>Sub-item d</i>						
<i>Sub-item e</i>						
<i>Sub-item f</i>						
<i>Sub-item g</i>						
<i>Sub-item h</i>						
<i>Publicações</i>			2			2
<i>Defesas de Doutorado</i>			2			2

Equipe:

Amélia Góes Araújo

Bruno Braga Sangiorgi

Danuta Sastre

Ildercílio Mota de Souza Lima

Josiane Lilian dos Santos Schiavinato

Rodrigo Alexandre Panepucci)

Colaboradores:

David Livingstone Alves Figueiredo

Dimas Tadeu Covas

Miguel Mano

Najeh Maissar Khalil

Rubiana Mara Mainardes

Rui Celso Martins Mamede

Referencias:

- Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**, 215-233.
- Elmen, J., et al. (2008) Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res*, **36**, 1153-1162.
- INCA (2002) *Falando sobre o câncer de boca*.
- Jemal, A., et al. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, **61**, 69-90.
- Krutzfeldt, J., et al. (2006) Strategies to determine the biological function of microRNAs. *Nat Genet*, **38 Suppl**, S14-19.
- McBride, D., et al. (2013) The mortality and cancer experience of New Zealand Vietnam war veterans: a cohort study. *BMJ Open*, **3**, e003379.
- Naguibneva, I., et al. (2006) An LNA-based loss-of-function assay for micro-RNAs. *Biomed Pharmacother*, **60**, 633-638.
- Orom, U.A., et al. (2006) LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene*, **372**, 137-141.
- Shalgi, R., et al. (2009) Coupling transcriptional and post-transcriptional miRNA regulation in the control of cell fate. *Aging (Albany NY)*, **1**, 762-770.
- Taylor, D.L. (2007) Past, present, and future of high content screening and the field of cellomics. *Methods Mol Biol*, **356**, 3-18.
- Xia, X. & Wong, S.T. (2012) Concise review: a high-content screening approach to stem cell research and drug discovery. *Stem Cells*, **30**, 1800-1807.