UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

BRUNO BRAGA SANGIORGI

**A abordagem de *high-content screening* para identificação de miRs com potencial
terapêutico no câncer de cabeça e pescoço**

Ribeirão Preto

2017

BRUNO BRAGA SANGIORGI

A abordagem de *high-content screening* para identificação de miRs com potencial terapêutico no câncer de cabeça e pescoço

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação

Sangiorgi, Bruno Braga

A abordagem de *high-content screening* para identificação de miRs com potencial terapêutico no câncer de cabeça e pescoço / Bruno Braga Sangiorgi; orientador: Rodrigo Alexandre Panepucci. – 2017
139 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Versão original

1. Câncer de cabeça e pescoço. 2. *High-Content Screening*. 3. miRs. 4. Transição epitélio-mesenquimal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SANGIORGI, Bruno Braga

Título: A abordagem de *high-content screening* para identificação de miRs com potencial terapêutico no câncer de cabeça e pescoço

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Genética

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci, por sua confiança e dedicação à construção deste trabalho e por muito ter me ensinado em todos esses anos de convivência, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

A todos os membros do Laboratório de Biologia Funcional, pelo apoio e assistência. Em especial, ao Me. Ildercílio Lima e à Dra. Josiane Schiavinato por toda ajuda e assistência indispensáveis à realização desta pesquisa.

À Susie Nalon, secretária do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela boa vontade e paciência.

À Maria Luiza Sangiorgi, por todo seu companheirismo, apoio e também pela participação ativa na construção deste trabalho.

À minha família, pelo grande apoio sempre recebido. Em especial, a Maria Tereza Braga e Ugo Sangiorgi, grandes entusiastas deste e de todos os meus empreendimentos.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de doutorado, processo nº 2014/20756-5.

E a todos os demais que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Muito obrigado.

“A razão é o passo, o aumento da ciência o caminho, e o benefício da humanidade é o fim” (Thomas Hobbes).

RESUMO

SANGIORGI, Bruno Braga. **A abordagem de *high-content screening* para identificação de miRs com potencial terapêutico no câncer de cabeça e pescoço.** 2017. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Como em diversos tumores sólidos, no câncer de cabeça e pescoço (HNSCC) a presença de metástases é um importante fator de mal prognóstico. Até o momento, estudos indicam que, no microambiente inflamatório tumoral, a estimulação com o Fator de Necrose Tumoral Alpha (TNF- α) leva à ativação de diferentes vias moleculares, como a via do Fator Nuclear Kappa-B (NF-kB) e PI3K/AKT, que inibem GSK3 β e consequentemente, promovem a estabilização e translocação nuclear de SNAIL e beta-catenina. De um modo geral, em diversos tipos de câncer, enquanto beta-catenina tem ação em promover a proliferação celular, membros da família SNAIL são capazes de induzir o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT). Sabe-se que os eventos de EMT estão envolvidos tanto na iniciação de metástases quanto na geração de células-tronco tumorais (CSCs), que por sua vez estão associadas à falha terapêutica e recidiva, devido à características que lhe conferem resistência aos tratamentos convencionais. Ao silenciar a expressão gênica de modo pós-transcricional, microRNAs (miRs) tem sido associados à regulação tanto da EMT quanto da geração de CSCs. Com uso da abordagem de *High-Content Screening* (HCS, análise celular multiparamétrica quantitativa por microscopia automatizada), buscamos investigar a capacidade de um grupo de 30 miRs humanos, muitos deles envolvidos em vias inflamatórias e na pluripotência, em modular aspectos relacionados a sobrevivência celular e EMT, em uma linhagem celular derivada de HNSCC (FADU) sob estímulo inflamatório. Inicialmente, avaliamos o potencial do TNF- α em modular parâmetros morfológicos, bem como a presença/localização de proteínas relacionadas com a EMT e capacidade migratória. Posteriormente, avaliamos o efeito de moléculas miméticas dos miRs em suprimir ou potencializar a sobrevivência celular e EMT em células estimuladas com TNF- α , seguido da identificação de transcritos alvos preditos (bem como das vias de sinalização enriquecidas para estes alvos) comumente alvejados por grupos de miRs que levaram a alterações multiparamétricas similares. De modo geral, miRs que alvejam *RELA* e *AKT2/AKT3* foram responsáveis pela redução na proliferação celular e EMT, enquanto o oposto foi observado em miRs que alvejam *GSK3B* e *ARHGAP5* (inibidor de RhoA). O silenciamento por siRNAs específicos contra *RELA* e *CTNNB1*, causou à redução na sobrevivência celular, enquanto que o silenciamento de *AKT1* e *CTNNB1* levou à redução na expressão proteica de SNAIL/SLUG. Finalmente, o silenciamento de *RELA*, *AKT1*, *GSK3B* e *CTNNB1* levou a redução na sobrevivência celular e indução a apoptose mesmo na ausência de estimulação com TNF- α . Como um todo, nós demonstramos que a abordagem de HCS permitiu a identificação de miRs com efeitos fenotípicos similares (no contexto de proliferação e EMT) e que, a predição de alvos compartilhados por estes miRs, levou à identificação de alvos e vias de sinalização relevantes do ponto de vista terapêutico.

Palavras-Chave: Câncer de cabeça e pescoço. *High-content Screening*. MiRs. Transição epitélio-mesenquimal.

ABSTRACT

SANGIORGI, Bruno Braga. **The high-content screening approach for the identification of miRs with therapeutic potential in head and neck cancer.** 2017. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Like many solid cancers, in head and neck cancer (HNC) the presence of metastases is an important factor of poor prognosis. To date, studies indicate that, in the tumor inflammatory microenvironment, stimulation with Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) leads to the activation of different molecular pathways, such as the Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B) and PI3K/AKT pathway, inhibiting GSK3 β and the degradation of SNAIL and beta-catenin, stabilizing them promoting their nuclear translocation. In general, in several types of cancer, while beta-catenin acts to promote cell proliferation, members of the SNAIL family induce the epithelial-mesenchymal (EMT) transition process. It is known that EMT events are involved both in the initiation of metastases and generation of cancer stem cells (CSCs), which in turn are associated with therapeutic failure and relapse, due to its properties that confer resistance to conventional treatments. By silencing gene expression in a post-transcriptional fashion, microRNAs (miRs) have been associated with the regulation of both EMT and CSCs generation. Using the High-Content Screening (HCS) approach, we sought to investigate the ability of a group of 30 human miRs, many of them involved in inflammatory pathways and pluripotency, to modulate aspects related to cell survival and EMT, in a HNSCC-derived cell line (FADU) under inflammatory stimuli. Initially, we evaluated the potential of TNF- α in modulating morphometric parameters, as well as the presence/location of EMT-related proteins and migratory capacity. Subsequently, we evaluated the effect of miRs mimetic molecules on suppressing or potentiating cell survival and EMT in TNF- α -stimulated cells, followed by the identification of predicted target transcripts (as well as signaling pathways enriched for these targets) commonly targeted by groups of miRs that led to similar multiparametric changes. Overall, miRs that targeted *RELA* and *AKT2/AKT3* were responsible for the reduction in cell proliferation and EMT, while the opposite was observed in miRs that targeted *GSK3B* and *ARHGAP5* (RhoA inhibitor). Gene silencing by specific siRNAs against *RELA* and *CTNNB1* caused a reduction in cell survival, while silencing of *AKT1* and *CTNNB1* led to reduced protein expression of SNAIL/SLUG. Finally, the silencing of *RELA*, *AKT1*, *GSK3B* and *CTNNB1* led to a reduction in cell survival and induction of apoptosis even in the absence of TNF- α stimulation. As a whole, we demonstrated that the HCS approach allowed the identification of miRs with similar phenotypic effects (in the context of proliferation and EMT) and that the prediction of targets shared by these miRs led to the identification of relevant targets and signaling pathways from the therapeutic point of view.

Keywords: Head and neck cancer. High-content Screening. MiRs. Epithelial-Mesenchymal Transition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alterações histológicas durante a formação do carcinoma de cabeça e pescoço.....	16
Figura 2 - O papel de vias de sinalização coordenadas por RTKs no câncer de cabeça e pescoço.....	18
Figura 3 - A ativação de NF- κ B no câncer de cabeça e pescoço.....	20
Figura 4 - Alterações fenotípicas durante a transição epitélio-mesenquimal.....	23
Figura 5 - Vias moleculares associadas a EMT, ativadas através da sinalização por TNF- α	25
Figura 6 - Biogênese de microRNAs.....	26
Figura 7 - O papel de microRNAs na sobrevivência celular e EMT no HNSCC.....	28
Figura 8 - Rede de regulação gênica em tecidos metastáticos derivados de câncer de células escamosas de hipofaringe.....	29
Figura 9 - Vantagens da abordagem de ensaios de microscopia baseados em células.....	32
Figura 10 - Morfologia da linhagem celular FADU.....	37
Figura 11 - O sistema de <i>High-Content Screening</i> : ImageXpress® Micro XLS.....	41
Figura 12 - Segmentação e análise de imagens realizada com auxílio do <i>software</i> MetaXpress, módulo Cell Scoring.....	42
Figura 13 - Segmentação de imagens realizada com auxílio do <i>software</i> CellProfiler.....	42

Figura 14 - Representação gráfica da formação da área livre de células com uso de placas de cultura Oris Pro.....	45
Figura 15 - Fluxograma ilustrativo da identificação de alvos preditos e vias moleculares reguladas por microRNAs.....	46
Figura 16 - Avaliação quantitativa de alterações morfológicas induzidas por TNF- α	51
Figura 17 - Avaliação de alterações na expressão de proteínas relevantes em eventos de EMT, após estimulação com TNF- α	53
Figura 18 - Avaliação da redução na proliferação celular causada por Mitomicina C.....	54
Figura 19 - Avaliação do papel do TNF- α na migração celular.....	55
Figura 20 - Alterações no nível relativo de expressão gênica devido ao tratamento com TNF- α	56
Figura 21 - Seleção do reagente de transfecção.....	57
Figura 22 - Avaliação funcional do protocolo de transfecção.....	58
Figura 23 - Grupos de microRNAs com base em alterações fenotípicas multiparamétricas.....	61
Figura 24 - Diagramas de Venn.....	62
Figura 25 - Vias moleculares enriquecidas com alvos preditos em comum a grupos de microRNAs.....	64
Figura 26 - Avaliação do silenciamento da expressão gênica de microRNAs com efeito pró e anti-proliferativo/EMT.....	68
Figura 27 - Avaliação da eficácia de silenciamento da expressão gênica dos siRNAs utilizados.....	69

Figura 28 - O papel de componentes de vias inflamatórias na sobrevivência celular e EMT.....	70
--	----

Figura 29 - Alterações na morte celular devido ao silenciamento de componentes de vias inflamatórias.....	71
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de moléculas miméticas de microRNA do LFbio.....	38
Tabela 2 - Lista de moléculas comerciais de siRNA utilizadas.....	38
Tabela 3 - Lista de Primers utilizados, sequência dos primers e temperatura de <i>melting</i> (TM).....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 As bases moleculares do câncer de cabeça e pescoço	16
1.2 O microambiente inflamatório no câncer de cabeça e pescoço	19
1.3 A transição epitélio-mesenquimal.....	21
1.4 A interface entre microRNAs e inflamação na progressão tumoral e metástase no câncer de cabeça e pescoço.....	25
1.5 O potencial da abordagem de high-content screening na identificação de microRNAs com potencial terapêutico	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Modelo celular.....	36
3.2 Drogas, corantes e anticorpos utilizados	37
3.3 Moléculas de RNA interferente.....	37
3.4 Transfecção reversa.....	39
3.5 Imunomarcacão	40
3.6 Aquisição e análise de imagens.....	40
3.7 Ensaios funcionais baseados em high-content screening.....	43
3.8 Ensaios de migração celular	44
3.9 Identificação de alvos preditos por microRNAs, com base em alterações fenotípicas multiparamétricas em comum.....	45

3.10 PCR quantitativo (qPCR)	46
3.11 Análises estatísticas.....	48
4 RESULTADOS	49
4.1 Avaliação de alterações morfológicas induzidas pela ação do Fator de Necrose Tumoral α	50
4.2 Avaliação de alterações na expressão de proteínas relacionadas com eventos de EMT, devido a ação do Fator de Necrose Tumoral α	52
4.3 Avaliação de alterações na migração celular devido a ação do Fator de Necrose Tumoral α	54
4.4 Avaliação do papel do TNF- α na expressão de genes relacionados a EMT	56
4.5 Estabelecimento das condições ideais de transfecção	56
4.6 Avaliação do papel de microRNAs em alterações fenotípicas multiparamétricas relacionadas com a sobrevivência celular e EMT.....	59
4.7 Identificação de alvos responsáveis pelos efeitos fenotípicos multiparamétricos comuns aos grupos de microRNAs identificados	62
4.8 Avaliação da eficiência de siRNAs no silenciamento da expressão gênica	68
4.9 Avaliação do papel de componentes de vias inflamatórias na sobrevivência celular e EMT.	69
4.10 Avaliação do papel de componentes de vias inflamatórias na morte-celular	71
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	104
ANEXO A - Certificado de dispensa de apreciação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa	105

ANEXO B - Vias moleculares significativamente enriquecidas com alvos preditos de grupos de microRNAs específicos	106
APÊNDICE	108
APÊNDICE A - Manuscrito a ser submetido para publicação	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 As bases moleculares do câncer de cabeça e pescoço

O câncer é um problema de saúde pública mundial que está entre as principais causas de morte, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (JEMAL et al., 2011). Dentre os diversos tipos de câncer, o câncer de cabeça e pescoço (HNSCC) compreende um grupo de neoplasias do trato aerodigestivo superior, que em conjunto estão entre os dez tipos de câncer com maior incidência e mortalidade no mundo (TORRE et al., 2015). Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC, do inglês *head and neck squamous cell carcinoma*), originados em células escamosas de mucosas de regiões orais (OSCC, do inglês *oral squamous cell carcinoma*), do esôfago (ESCC, do inglês *esophageal squamous cell carcinoma*), laringe (LSCC, do inglês *larynx squamous cell carcinoma*), faringe (PSCC, do inglês *pharynx squamous cell carcinoma*) e língua (TSCC, do inglês *Tongue squamous cell carcinoma*), dentre outros, correspondem a grande maioria dos casos de câncer de cabeça e pescoço (WIKNER et al., 2014). O processo que leva a formação deste tipo de câncer é compreendido por diversas etapas sucessivas observadas em alterações histológicas, tais como hiperplasia, displasia, carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo e metástase (figura 1) (SCANLON et al., 2013).

Figura 1 - Alterações histológicas durante a formação do carcinoma de cabeça e pescoço

FONTE: Scanlon et al., 2013.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço são hábitos de tabagismo (SCHLECHT et al., 1999; STURGIS; CINCIRIPINI, 2007) e etilismo (HASHIBE et al., 2007), que em conjunto podem aumentar em até 30 vezes o risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer (PELUCCHI et al., 2008). Nas últimas décadas, apesar de

ter sido observada uma redução na incidência de HNSCC, devido possivelmente a uma tendência mundial na redução do hábito de tabagismo, este efeito foi menos acentuado em cânceres de faringe, devido a um aumento na incidência de casos associados a infecções com o vírus do papiloma humano (HPV) (BUCKLEY et al., 2015).

O principal tratamento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço é a realização de cirurgia, podendo ou não ser combinado com radioterapia e quimioterapia a depender da gravidade da doença pacientes (SHIN; KHURI, 2013). O tratamento combinado é recomendado especialmente em casos de doença localmente avançada, o que corresponde a aproximadamente 60% dos pacientes (SHIN; KHURI, 2013). Após o tratamento, pacientes com câncer de cabeça e pescoço frequentemente apresentam disfagia, o que pode levar a complicações secundárias como desnutrição e desidratação, reduzindo assim as chances de sobrevivência do paciente (SCHINDLER et al., 2015).

Estudos realizados em seres humanos e modelos animais indicam que o desenvolvimento do câncer depende de uma série de mutações que levam a conversão progressiva de uma célula normal em uma célula cancerosa (HANAHA; WEINBERG, 2000). Em conjunto, ao menos seis alterações ou características marcantes (do inglês: *hallmark*) são consideradas como essenciais para o desenvolvimento de células cancerosas: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores do crescimento, evasão de morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e capacidade metastática (HANAHA; WEINBERG, 2000). Estudos realizados até o momento indicam que o desenvolvimento de tais características está relacionado a mutações no sentido tanto de inibir a função de genes envolvidos na inibição da progressão tumoral (supressores tumorais) quanto de potencializar a atividade ou conferir uma nova função a genes envolvidos na potencialização da progressão tumoral (oncogenes) (BAEISSA et al., 2016). Atualmente, é conhecida a participação de diversas vias moleculares associadas a iniciação e progressão tumoral no câncer de cabeça e pescoço, a exemplo de wnt/beta catenina, proteína quinase associadas a mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/AKT, dentre outras (SHIAH; SHIEH; CHANG, 2016; SIMPSON; MELL; COHEN, 2015).

De acordo com o modo canônico de sinalização, a via wnt/beta catenina é ativada pela interação entre ligantes Wnt e receptores Frizzled, levando a dissociação do complexo de destruição da proteína beta-catenina e seu acúmulo no citoplasma, culminando com a sua translocação nuclear e interação com fatores de transcrição “Fator de célula T/Fator estimulador de linfócitos” (TCF/LEF) (LIU; MILLAR, 2010). A atividade transcricional de beta-catenina está relacionada a ativação de genes como c-Myc (envolvido na proliferação), ciclina D1 (mediador

do ciclo celular) e matriz metaloproteases (MMPs), proteínas envolvidas na migração e invasão celular (SHIAH *et al.*, 2016). Estudos recentes indicaram que em pacientes com HNSCC, é frequente a ocorrência da metilação em regiões promotoras de genes envolvidos com a inibição da via Wnt/beta catenina, levando a sua ativação constitutiva nas células cancerosas, o que esteve relacionado com o pior prognóstico (PALUSZCZAK *et al.*, 2015).

Similarmente à via Wnt/beta catenina, as vias moleculares MAPK e PI3K/AKT, reguladas por receptores de tirosina quinases (RTKs), também se encontram desreguladas em diversas regiões anatômicas do HNSCC (Figura 2) (ISAACSSON VELHO; CASTRO; CHUNG, 2015; SIMPSON *et al.*, 2015). Em resumo, a transdução de sinal iniciada pela estimulação de uma classe de RTKs composta por receptores de fator de crescimento, resulta na conversão de fosfatidilinositol 2-fosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP₃) (LIEN; DIBBLE; TOKER, 2017). Em seguida, PIP₃ induz a fosforilação e mudanças conformacionais em AKT, uma serina/treonina quinase que leva a ativação de diversas outras proteínas envolvidas no metabolismo celular e proliferação (SIMPSON *et al.*, 2015). Além disso, estimulação de RTKs leva à ativação do oncogene *RAS*, iniciando uma cascata de fosforilação culminando com a ativação tanto da via PI3K/AKT, quanto das MAPK: ERK1 e ERK2, que atuam na ativação de diversos fatores de transcrição relacionados ao crescimento tumoral (MURUGAN; MUNIRAJAN; TSUCHIDA, 2012). A sinalização por fatores de crescimento também possibilita a ativação da via wnt através da inativação de “Glycogen synthase kinase-3 beta” (GSK3β), uma serina/treonina quinase com ação em substratos proteicos de diversas proteínas, a exemplo da beta-catenina, levando a sua subsequente degradação proteolítica (DOBLE; WOODGETT, 2007).

Figura 2 - O papel de vias de sinalização coordenadas por RTKs no câncer de cabeça e pescoço

FONTE: Isaacsson Velho *et al.*, 2015.

Os estudos realizados até o momento acerca do papel de diferentes vias moleculares no câncer de cabeça pescoço apresentam uma importância tanto etiológica quanto terapêutica, tendo em vista que o conhecimento de vias moleculares relacionadas a iniciação e progressão tumoral podem ser exploradas no sentido de se desenvolver terapias específicas contra células cancerosas. Entretanto, ensaios clínicos conduzidos até o presente momento demonstraram a ineficácia do uso de drogas mais específicas, a exemplo do inibidor do receptor de EGF (EGFR) cetuximab, em relação a drogas de ação mais genéricas como taxanos e cisplatina no combate ao HNSCC (BAXI; SHER; PFISTER, 2014; SWIECICKI; MALLOY; WORDEN, 2016). Portanto, ainda se faz necessário o estudo de vias moleculares envolvidas na iniciação e progressão tumoral no câncer de cabeça e pescoço, no sentido de se identificar novos alvos terapêuticos contra este tipo de câncer.

1.2 O microambiente inflamatório no câncer de cabeça e pescoço

Na última década, o microambiente inflamatório tem sido considerado como a sétima característica marcante do câncer, tendo em vista a associação entre a inflamação crônica e a predisposição a diversas formas de câncer, bem como a presença de um componente inflamatório no microambiente da maioria de tecidos neoplásicos (COLOTTA et al., 2009). Estudos realizados até o presente momento observaram uma relação causal entre o desenvolvimento do câncer gástrico, de bexiga e de esôfago, dentre outros, e a presença de agentes infecciosos que contribuem para a formação de um ambiente inflamatório (FRANCESCONI; HOU; GRIVENNIKOV, 2014). Além disso, independentemente do estabelecimento de infecções, a maioria dos tecidos neoplásicos apresentam infiltrados de células imunocompetentes, a exemplo de macrófagos (que podem representar até 50% da massa tumoral), células dendríticas e linfócitos, que estão conhecidamente envolvidos na progressão tumoral (SOLINAS et al., 2009).

Em células tumorais, o microambiente inflamatório é iniciado a partir tanto de vias extrínsecas, devido à presença infecções ou inflamações, quanto por vias intrínsecas, caracterizada por mutações responsáveis por ativar vias inflamatórias nas próprias células tumorais (MANTOVANI et al., 2008). Nesse contexto, o fator de transcrição NF- κ B é um elemento chave na interface entre o estabelecimento de inflamações crônicas e o desenvolvimento de neoplasias, tendo em vista sua participação em ambos os processos (MANTOVANI; GARLANDA; ALLAVENA, 2010). De acordo com o modelo clássico (ou canônico) de sinalização da via NF- κ B, a estimulação com citocinas inflamatórias ou padrões moleculares

associados a patógenos (PAMPs), leva a ativação do complexo de proteínas composto por IKK γ (NEMO) e I κ B quinases (IKK1/2), responsáveis pela fosforilação e indução a degradação do repressor I κ B, liberando o fator de transcrição NF- κ B, composto majoritariamente por P65 (RelA)/p50 (IWAI, 2012; MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016). No contexto do câncer de cabeça e pescoço, o hábito de tabagismo e consequente exposição a espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos ao DNA, têm como consequência a indução a síntese de citocinas inflamatórias, principalmente do Fator de Necrose Tumoral Alpha (TNF- α), e consequentemente, ativação de NF- κ B (CHURG et al., 2002). Alternativamente, a sinalização via PI3K/AKT e MAPK devido a estimulação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), superexpresso em aproximadamente 90% dos casos de HNSCC, estão também envolvidos na degradação de I κ B e ativação da via NF- κ B (VANDER BROEK et al., 2014) (Figura 3). As citocinas inflamatórias expressas devido a ativação constitutiva de NF- κ B em células cancerosas, por vias e mecanismos diversos, são responsáveis por ativar vias inflamatórias também em células imunocompetentes, estabelecendo então um microambiente de inflamação crônica conhecido como inflamação relacionada ao câncer, ou CRI (MANTOVANI *et al.*, 2010).

Figura 3 - A ativação de NF- κ B no câncer de cabeça e pescoço

FONTE: Vander Broek *et al.*, 2014.

Estudos realizados até o momento indicam que NF- κ B, além de estar constitutivamente ativo em diversos tipos distintos de câncer, apresenta um papel central na iniciação e progressão

tumoral, bem como resistência ao tratamento (RAPOSO et al., 2015). Genes envolvidos tanto na inibição a apoptose (membros da família Bcl e proteínas inibidoras de apoptose/IAPs) quanto na indução ao progresso no ciclo celular (cliclina D1 e fatores de crescimento) são alvos conhecidos desse fator de transcrição (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009). As citocinas inflamatórias estimuladas pela atividade de NF- κ B estão associadas com o aumento da expressão de MMPs e expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), promovendo a migração celular e vascularização tumoral, respectivamente (HOESEL; SCHMID, 2013). No contexto do câncer de cabeça e pescoço, a superexpressão de *RELA* em tecidos neoplásicos oriundos de diferentes regiões anatômicas, esteve associada a redução na sobrevivência em pacientes sob radioterapia ou quimioterapia (QUINTANA et al., 2013). Adicionalmente, a superexpressão de *RELA* em tecidos de carcinoma de células escamosas de esôfago (ESCC), esteve associada a maior capacidade invasiva e metástases nos linfonodos (WANG, F. et al., 2013). Interessantemente, em diferentes estudos conduzidos com amostras teciduais oriundas de diferentes regiões anatômicas de HNSCC, foi observado que a superexpressão de citocinas inflamatórias, principalmente interleucina (IL-) 6 (IL-6) e TNF- α , estiveram associadas com diversos aspectos relacionados com o mau prognóstico, a exemplo do aumento na capacidade migratória/invasiva, estágios clínicos mais avançados e resistência a quimioterapia (GAO; ZHAO; HALSTENSEN, 2016; KRISHNAN et al., 2014; NAKANO et al., 1999).

Em conjunto, as associações observadas entre a expressão/atividade de NF- κ B e o mau prognóstico, bem como no aumento da capacidade invasiva e presença de tumores secundários, indicam uma relação entre o microambiente inflamatório e o desenvolvimento de metástases, a principal causa de mortalidade por câncer (CHEN, C. et al., 2013). Nas últimas décadas, os avanços obtidos na terapêutica contra o HNSCC esteve em grande parte limitado ao tratamento loco-regional da doença, tendo em vista o crescimento na mortalidade associada a metástases distantes nos últimos 40 anos (ALLEN et al., 2013). Portanto, o estudo das relações entre a atividade de NF- κ B e aspectos relacionados ao desenvolvimento de metástases podem fornecer informações relevantes no combate ao HNSCC.

1.3 A transição epitélio-mesenquimal

A metástase, principal causa de morte pelo câncer no mundo, é caracterizada pela colonização de tecidos secundários por células cancerosas originadas do tumor primário (MASSAGUE; OBENAUF, 2016). Eventos metastáticos têm início no extravasamento de células

do tumor primário para os vasos sanguíneos adjacentes, onde as células tumorais circulantes necessitam sobreviver a ataques do sistema imune e *stress* oxidativo (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002). Em seguida, as células tumorais extravasam para o parênquima de sítios secundários, onde iniciam um processo de colonização que irá depender tanto da capacidade proliferativa das células tumorais quanto da sua resistência ao ataque de células do sistema imune (OBENAUF et al., 2015).

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um evento gradual caracterizado por mudanças fenotípicas drásticas que levam células a adquirir uma morfologia tipicamente fibroblastóide, aumentando tanto a sua capacidade migratória quanto invasiva (Figura 4) (DIEPENBRUCK; CHRISTOFORI, 2016). De um modo geral, diversos mecanismos mecanossensoriais relevantes em eventos de EMT são controlados por Rho GTPases, principalmente Rac1, Cdc42 e RhoA, que integram a família Ras-like GTPases (ZEGERS; FRIEDL, 2014). Importaneamente, tais proteínas promovem a desestabilização de complexos proteicos, a exemplo dos complexos CRUMBS e PAR, que participam tanto da polaridade apico-basal quanto da estabilidade de proteínas de adesão célula-célula (ZEGERS; FRIEDL, 2014). Adicionalmente, Rho GTPases também modulam a reorganização da actina cortical de modo a favorecer o alongamento celular e aumento de motilidade, através da formação da actina filamentosa (F-actina) e sua polimerização em fibras de *stress*, elementos que em associação com filamentos de miosina não-muscular (miosina II), integram filamentos de actomiosina que participam de projeções citoplasmáticas e promovem a contractilidade celular, bem como polaridade frente-traseira (LEE; KUMAR, 2016). Importaneamente, eventos de EMT são também acompanhados pelo aumento na expressão de proteínas responsáveis por degradar a matriz extracelular (MMPs), além de alterações no perfil de expressão de proteínas de adesão. Mais especificamente, células em EMT tipicamente são sujeitas a perda da expressão de E-Caderina, considerada como um marcador de EMT, concomitantemente ao aumento da expressão de N-Caderina, um fenômeno denominado *cadherin-switching* (WHEELOCK et al., 2008). Digno de nota, a redução na expressão de E-Caderina também leva a dissociação de sua ligação com beta-catenina, promovendo seu acúmulo no citoplasma e translocação nuclear (SHIAH et al., 2016).

Figura 4 - Alterações fenotípicas durante a transição epitélio-mesenquimal

Alterações morfológicas e de proteínas associadas aos fenótipos epitelial (em laranja) e mesenquimal (em verde), resultantes do processo de Transição Epitélio-Mesenquimal. FONTE - Zavadil e Bottinger, 2009.

Estudos realizados até o presente momento indicam de modo contundente o papel da EMT na fase inicial de metástases, aquela caracterizada pelo escape das células do tumor primário para a microvasculatura tumoral (DIEPENBRUCK; CHRISTOFORI, 2016). Importaneamente, estudos realizados em modelos murinos observaram que a modulação de genes envolvidos na EMT, em células cancerosas, resultou em alterações na capacidade de tumores, oriundos dessas células, em formar metástases (YE; WEINBERG, 2015). Além disso, diferentes estudos observaram que em comparação com células derivadas do tumor primário, células tumorais circulantes apresentam uma expressão mais acentuada de marcadores mesenquimais (KALLERGI et al., 2011; YU, M. et al., 2013). No contexto do câncer de cabeça e pescoço, diferentes estudos observaram que a presença de marcadores de EMT esteve associada a quadros clínicos mais avançados, ocorrência de metástases e redução na sobrevida (GRAVES et al., 2014).

Diferentes estudos observaram que eventos de EMT estão relacionados com a de-diferenciação de células cancerosas, gerando células com características de células tronco, tais como capacidade de auto renovação e diferenciação, denominadas células-tronco cancerosas (CSC), que são responsáveis pela formação de diferentes subtipos celulares, proporcionando a formação da heterogeneidade celular intratumoral, o que está associado tanto a falha terapêutica quanto recidiva (MARIE-EGYPTIENNE; LOHSE; HILL, 2013). Até o presente momento, diferentes estudos observaram que no contexto do HNSCC, a EMT leva a geração de células caracterizadas pela alta expressão de CD44 e aldeído desidrogenase-1 (ALDH1), que apresentam características similares a CSC (MASUI et al., 2014; OTA et al., 2016; SEINO et al., 2016).

O processo de transição epitélio-mesenquimal está sob a regulação de um conjunto de fatores de transcrição, principalmente SNAIL1 e SNAIL2 (SLUG), Twist e membros da família *zinc-finger E-boxbinding* (ZEB), que em conjunto são denominados os “reguladores mestres” da EMT (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). Uma vez ativados, tais fatores de transcrição são

responsáveis tanto pelo silenciamento da expressão de genes envolvidos com o fenótipo epitelial, quanto pela ativação daqueles envolvidos com o fenótipo mesenquimal (ZHENG; KANG, 2014). Essa dupla ação em reprimir e ativar genes, apresentada pelos reguladores mestres da EMT, pode ser ilustrado pelo papel de SNAIL e SLUG em promover eventos de *cadherin-switching*, ao atuarem tanto como repressores de *CHD1* (E-caderina) quanto ativadores de *CHD2* (N-Caderina) (LAMOUILLE *et al.*, 2014).

No contexto do câncer de cabeça e pescoço, diferentes estudos observaram que alterações na expressão dos reguladores mestres da EMT são capazes de impactar na capacidade metastática de células cancerosas e também no prognóstico de pacientes (GRAVES *et al.*, 2014). Em um estudo recente realizado em tecidos tumorais de pacientes com HNSCC em diferentes regiões anatômicas, a expressão de SLUG esteve relacionada tanto com o fenômeno de *cadherin-switching* quanto com o desenvolvimento de metástases em linfonodos e quadros clínicos mais graves (ZHANG *et al.*, 2013). Em linha com o que foi observado, Mendelsohn e colaboradores observaram que a expressão de SNAIL esteve significativamente associada com lesões menos diferenciadas, pior prognóstico e ocorrência de metástases (MENDELSON *et al.*, 2012).

O processo de transição epitélio-mesenquimal é coordenado através de estimulações oriundas do microambiente externo, podendo ser desencadeado a partir da estimulação por diversos fatores presentes no microambiente tumoral, tais como fatores de crescimento, fator de transformação de crescimento-beta (TGF- β), Wnt e TNF- α (LAMOUILLE *et al.*, 2014). Eventos de EMT são também regulados por mecanismos mediados por contato celular, que regulam por exemplo a reorganização espacial de receptores de TGF- β para regiões de contato intercelular em condições de alta densidade, tornando as células insensíveis a estímulos indutores de EMT (ATTISANO; WRANA, 2013). Nesse sentido, a simples variação na densidade celular é capaz de alterar a parâmetros morfométricos e proteínas envolvidas com a EMT, de modo a direcionar a maquinaria celular para a manutenção do fenótipo epitelial em função do aumento na densidade celular (CICHON; NELSON; RADISKY, 2015).

Estudos realizados até o presente momento observaram um papel importante de NF- κ B na indução da EMT através da estimulação por TNF- α , embora os mecanismos inerentes a esta relação ainda não tenham sido extensivamente elucidados (Figura 5) (WU; ZHOU, 2010). A depender do contexto celular, a atividade de NF- κ B resulta na ativação de AKT, que por sua vez, atua na inibição de GSK3 β , uma proteína envolvida na degradação de SNAIL, resultando no acúmulo desse fator de transcrição, que sofre translocação nuclear e exerce sua função de induzir a EMT (WANG, H.; FANG, R.; *et al.*, 2013; WANG, H.; WANG, H. S.; *et al.*, 2013).

Adicionalmente, o acúmulo de beta-catenina decorrente tanto da inibição de GSK3 β quanto da sua dissociação com E-caderina, também apresenta um papel importante na EMT induzida por TNF- α , devido ao seu papel em promover a expressão de genes relacionados a EMT em diferentes contextos celulares (GHAHHARI; BABASHAH, 2015). Recentemente, foi observada a atividade de NF- κ B (P65) em ligar-se a regiões promotoras de TWIST e SNAIL2, indicando a sua atividade direta na regulação de genes relevantes na EMT (PIRES et al., 2017). Como um todo, estudos realizados até o momento fornecem indícios de que a estimulação com citocinas inflamatórias, no câncer de cabeça e pescoço, apresenta um papel central na regulação de vias moleculares conhecidamente envolvidas com a progressão tumoral e metástase, tais como Wnt/beta-catenina, PI3K/AKT e NF- κ B (Figura 5).

Figura 5 - Vias moleculares associadas a EMT, ativadas através da sinalização por TNF- α

FONTE: WU; ZHOU, 2013.

1.4 A interface entre microRNAs e inflamação na progressão tumoral e metástase no câncer de cabeça e pescoço

Nas últimas décadas, os microRNAs emergiram como uma classe de moléculas de RNA não codificante, com ação em regular a expressão gênica de modo pós-transcricional. A biogênese de microRNAs têm início na transcrição gênica, gerando transcritos poliadenilados de microRNA primário (pri-microRNA) que se dobram sobre si, formando estruturas em formato de “grampo de cabelo” (do inglês *hairpin*) (BARTEL, 2004). Ainda no núcleo, tais estruturas são processadas e pela RNase III DROSHA, dentre outras enzimas, resultando na formação de moléculas de pre-microRNA, que são exportadas para o citoplasma com auxílio da enzima Exportina (BARTEL, 2004). Alternativamente, a classe de microRNAs denominadas

mirtrons (microRNAs/introns) são capazes de gerar moléculas de pre-microRNAs através do mecanismo de *splicing* (XIE; STEITZ, 2014). De todo modo, moléculas de pre-microRNA são processadas pela RNase III DICER, resultando na formação de moléculas de fita dupla de RNA (de aproximadamente 22 nucleotídeos), que após a associação com enzimas argonautas, sofrem dissociação de uma das fitas (3' ou 5'), formando o microRNA maduro (LEE et al., 2003). Em conjunto, o microRNA maduro e enzimas argonautas formam Complexo de Silenciamento Mediado por RNA (RISC), responsável por direcionar as moléculas de microRNA aos seus transcritos alvo, onde deverá ocorrer o silenciamento da expressão gênica (Figura 6) (FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008).

Figura 6 - Biogênese de microRNAs

FONTE: FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008.

A partir da complementaridade de bases, os microRNAs associam-se a sítios de ligação específicos presentes na “região não traduzida 3'” (3' UTR) de RNAs mensageiros alvo, regulando a sua tradução a partir de diferentes mecanismos que dependem, além de outros fatores, da extensão dessa complementaridade (BHAT; JARMOLOWSKI; SZWEYKOWSKA-KULINSKA, 2016). De um modo geral, uma complementaridade imperfeita resulta na inibição da tradução, a partir da inibição da formação do ribossomo, ou mesmo da indução a sua

dissociação de modo precoce (FILIPOWICZ *et al.*, 2008). Além disso, ela pode resultar, com participação do complexo RISC e proteínas de ligação a poly-A, na deadenilação e degradação do mRNA alvo (EULALIO *et al.*, 2009). De outro modo, a complementaridade perfeita entre microRNA e a região 3'UTR resulta na clivagem do mRNA alvo, através da ação de enzimas do complexo RISC (EULALIO; HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2008). Estes diversos níveis de regulação, dependentes de complementaridade, contribuem para a capacidade de moléculas de microRNAs em regular a expressão de uma grande diversidade de genes simultaneamente, integrando vias complexas de sinalização envolvendo muitas vezes *loops* auto-regulatórios com a participação de fatores de transcrição (BRACKEN; SCOTT; GOODALL, 2016).

Até o presente momento, diversos estudos elucidaram a participação de microRNAs na regulação da maioria dos processos biológicos conhecidos, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (HA; KIM, 2014). No HNSCC, estudos de expressão gênica comparativos entre amostras teciduais saudáveis e tumorais, de diferentes regiões anatômicas, identificaram perfis de microRNAs subexpressos e superexpressos em tecidos tumorais, indicando uma associação entre microRNAs e iniciação/progressão tumoral, como observado também em diferentes tipos de câncer (KOSHIZUKA *et al.*, 2017). Como um todo, estudos de expressão gênica e também estudos funcionais, observaram que muitos destes microRNAs apresentam papéis oncogênicos e supressores tumorais, respectivamente, ao promover e inibir vias moleculares conhecidamente envolvidas com a iniciação/progressão tumoral e metástases no HNSCC, a exemplo de Ras/MAPK, PI3K/AKT e JAK/STAT3 (HARADA *et al.*, 2016). Nesse mesmo contexto, também foi observado o papel de microRNAs em modular eventos de EMT, devido a sua atividade silenciar a expressão de genes codantes de reguladores mestres da EMT, ou envolvidos com proteínas de adesão e MMPs (Figura 7) (HARADA *et al.*, 2016).

Figura 7 - O papel de microRNAs na sobrevivência celular e EMT no HNSCC

MicroRNAs com papel em silenciar a expressão de genes envolvidos com a inibição (em azul) ou promoção (em azul) da proliferação/sobrevivência celular e EMT. FONTE - HARADA *et al*, 2016).

No contexto inflamatório, estudos realizados na última década revelaram que diversos microRNAs são alvos transcricionais de NF- κ B, a exemplo de miR-9, miR-21, miR-143, miR-146 e miR-224, muitos deles integrantes de circuitos auto regulatórios que modulam a atividade desse fator de transcrição (HOESEL; SCHMID, 2013). Além disso, microRNAs regulados pela via NF- κ B estão frequentemente superexpressos tanto em tecidos inflamados quanto em tecidos neoplásicos, e neste último, apresentam um papel importante na modulação da progressão tumoral e desenvolvimento de metástases (TONG; YUAN; WU, 2015). Mais especificamente, o miR-21, de ação oncogênica em diversos tumores sólidos e leucemias, têm ação em silenciar a expressão de *PTEN*, levando a ativação de AKT e consequentemente NF- κ B, que apresenta sítios de ligação na região promotora de *MIR21*, levando a um mecanismo em loop de amplificação da inflamação (TONG *et al.*, 2015). Interessantemente, em um estudo conduzido por Yan e colaboradores, com base em análises integradas envolvendo dados de expressão gênica, sítios de ligação de fatores de transcrição e dos microRNAs, foi observado o papel central de NF- κ B e P53, em uma rede regulatória compreendida por miR-21, miR-34 e diversos genes envolvidos com a inflamação, apoptose, proliferação, adesão, dentre outras, em tecidos metastáticos derivados de câncer oral e de hipofaringe (Figura 8) (YAN *et al.*, 2013).

Figura 8 - Rede de regulação gênica em tecidos metastáticos derivados de câncer de células escamosas de hipofaringe

A regulação exercida tanto a nível transcricional por NF- κ B e P53, quanto a nível pós-transcricional por miR-34 e miR-21, em genes envolvidos com respostas imunes (em verde), apoptose (azul escuro), angiogênese (amarelo), proliferação (vermelho), adesão (laranja), proteólise (rosa) e outros. FONTE - YAN *et al.*, 2013.

Apesar da grande relevância de ensaios de expressão gênica e análises *in silico* em identificar microRNAs com potencial oncogênico e supressor tumoral, as particularidades da maquinaria celular inerente a diferentes contextos celulares apresentam a capacidade de tornar células cancerosas não-responsivas à ação de determinados microRNAs, ou mesmo de levar a um efeito oposto àquele observado por diferentes neoplasias sob influência de um mesmo microRNA (JIANG, H. *et al.*, 2014). Por exemplo, apesar de diversos estudos até o presente terem observado que elementos da família miR-29 (miR-29a, miR-29b e miR-29c) apresentam efeitos relacionados a atividade supressora tumoral, como redução na proliferação celular e indução a apoptose, existem observações acerca da sua superexpressão em amostras oriundas de diferentes tecidos neoplásicos e metastáticos (JIANG, H. *et al.*, 2014; WANG, Y. *et al.*, 2013). Adicionalmente, apesar de diversos estudos terem observado a superexpressão, em tecidos neoplásicos derivados de HNSCC, de elementos do cluster miR-17-92 e seus parálogos: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, e miR-92a-1, estudos funcionais conduzidos com células oriundas de diferentes linhagens celulares derivadas de HNSCC, observaram a ação do miR-17 em inibir sua capacidade potencial migratória/invasiva (CHANG *et al.*, 2013; JING *et al.*, 2016). Em conjunto, tais observações ilustram a necessidade de estudos funcionais para avaliar o papel individual de moléculas de microRNA considerando o contexto celular em questão, de modo a complementar as observações feitas por estudos de expressão gênica, no sentido de

identificar aqueles microRNAs que terão efeitos preponderantes na iniciação/progressão tumoral, dentre o conjunto de microRNAs sub/superexpresso em tecidos neoplásicos.

1.5 O potencial da abordagem de *high-content screening* na identificação de microRNAs com potencial terapêutico

Observações sobre a participação de microRNAs na biologia do câncer possibilitaram o surgimento de uma nova linha investigativa na terapia contra o câncer, compreendida pelo uso tanto de moléculas miméticas de miRs envolvidos na supressão tumoral, quanto de moléculas de anti-miR, que apresentam como alvos os microRNAs endógenos envolvidos na progressão tumoral (JI; SUN; SU, 2017). Alternativamente, a expressão de determinados genes pode ser silenciada com o uso de moléculas sintéticas de dupla fita de RNA, denominadas RNA de silenciamento (siRNAs), que após processamento por DICER e entrada no complexo RISC, apresenta como alvo um transcrito gênico específico, o que evita o efeito por vezes indesejado do silenciamento de múltiplos alvos simultaneamente, proporcionado pela ação de microRNAs (TITZE-DE-ALMEIDA; DAVID; TITZE-DE-ALMEIDA, 2017). Em conjunto, moléculas sintéticas de RNA interferente estão sendo utilizadas em ensaios clínicos no intuito de avaliar a eficácia dessas moléculas em combater diversas enfermidades, incluindo o câncer (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017; TITZE-DE-ALMEIDA *et al.*, 2017).

Embora promissor, o desenvolvimento de terapias baseadas em RNA interferente apresenta diversos desafios, tais como a identificação dos alvos preditos por moléculas de microRNAs, validação de sua atividade em silenciar a expressão gênica e também avaliação funcional do seu efeito em células e tecidos neoplásicos. Embora sejam conhecidos os mecanismos de pareamento entre microRNAs e seus alvos, diversos fatores inerentes ao sítio de ligação, tais como sua extensão (em nucleotídeos), quantidade de sítios por alvo e composição molecular, irão determinar a eficácia do silenciamento por microRNAs (SEOK *et al.*, 2016). Devido a essa pluralidade de fatores, a predição dos transcritos alvos de microRNAs representam um desafio a comunidade científica atual. Até o presente momento, diversos algoritmos foram desenvolvidos no intuito de prever alvos de microRNAs com base tanto em características moleculares de potenciais sítios de ligação quanto em estudos de expressão gênica (AGARWAL *et al.*, 2015).

No intuito de avaliar o efeito de microRNAs em células derivadas de tecidos neoplásicos, estudos funcionais foram realizados com uso de bibliotecas comerciais de moléculas miméticas de miRs, sendo bem-sucedidos em identificar moléculas capazes de

modular eventos relevantes tais como a mortalidade celular e resistência a quimioterápicos (BHINDER et al., 2014; BOETTCHER et al., 2014; SEYHAN et al., 2012). De modo similar, com o uso de vetores retrovirais para a expressão de microRNAs, o grupo de Lindenberg-van e colaboradores identificou miRs letais para células derivadas de HNSCC (LINDENBERGH-VAN DER PLAS et al., 2013). Como um todo, tais estudos revelam a capacidade da abordagem funcional em identificar moléculas com potencial terapêutico contra o câncer.

Na última década, avanços na área da microscopia automatizada revelaram novas possibilidades de ensaios funcionais, permitindo a análise de um amplo espectro de alterações fenotípicas a nível celular (BICKLE, 2010). Tais possibilidades representam um avanço em relação a ensaios de luminescência, que frequentemente são limitados a leitura de no máximo dois sinais, desconsiderando alterações em parâmetros morfológicos e heterogeneidade da população celular (Figura 9) (XIA; WONG, 2012). De outro modo, abordagem de *High-Content Screening* (HCS), caracterizada por ensaios funcionais baseados em microscopia automatizada e análises de alto conteúdo, permite a avaliação de diversos parâmetros relacionados ao fenótipo celular, tais como aspectos morfológicos e referentes a presença/localização de proteínas de interesse, a partir da aquisição de imagens em células marcadas com reagentes fluorescentes específicos (anticorpos ou corantes) a compartimentos celulares, proteínas de interesse e ácidos nucleicos (BOUTROS; HEIGWER; LAUFER, 2015). De maneira geral, a abordagem de HCS se apresenta vantajosa especialmente quanto ao seu uso na avaliação de microRNAs com potencial terapêutico, tendo em vista que sua capacidade em quantificar uma grande quantidade alterações fenotípicas apresenta o potencial de abranger as diversas alterações desencadeadas pela ação dessas moléculas (SERVA; CLAAS; STARKUVIENE, 2011). Entretanto, apesar do potencial de avaliações multiparamétricas em ensaios de HCS, a grande maioria dos estudos realizados nas últimas décadas utilizando essa abordagem mensuraram no máximo dois parâmetros de interesse, o que provavelmente está relacionado a limitações inerentes a análise de imagens (SINGH; CARPENTER; GENOVESIO, 2014). Nesse sentido, avanços tem sido realizados em softwares especializados em análises de imagens, a exemplo do CellProfiler e EBImage, no sentido tanto de facilitar a identificação de regiões de interesse quanto de disponibilizar algoritmos capazes de mensurar, automaticamente, uma série de parâmetros morfométricos e referentes a proteínas de interesse (BOUTROS *et al.*, 2015).

Figura 9 - Vantagens da abordagem de ensaios de microscopia baseados em células

FONTE: XIA; WONG, 2012.

Tendo em vista o que foi dito, o presente trabalho foi realizado no intuito de avaliar, por meio de ensaios funcionais baseados em *High-Content Screening*, a capacidade de microRNAs em inibir/potencializar a sobrevivência celular e EMT, em células derivadas de uma linhagem celular e HNSCC e sujeitas a estímulo inflamatório. A identificação de moléculas com potencial ação supressora tumoral ou oncogênica, aliado a análises *in silico* acerca de potenciais alvos moleculares envolvidos, bem como ensaios funcionais com o uso de RNAs de silenciamento específicos a alvos preditos, apresenta o potencial em identificar moléculas de microRNAs e vias moleculares a serem exploradas no combate ao HNSCC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

A hipótese central deste estudo foi a de que a avaliação dos efeitos fenotípicos de diferentes microRNAs (no contexto de proliferação e Transição-Epitélio-Mesenquimal), em conjunto com a predição de alvos compartilhados por microRNAs com efeitos similares, permitiria a identificação de vias de sinalização relevantes do ponto de vista terapêutico. Assim, o objetivo geral deste estudo foi:

- Identificar vias e alvos potencialmente regulados por grupos de microRNAs com efeitos fenotípicos similares, no contexto da Transição-Epitélio-Mesenquimal de células de carcinoma de cabeça e pescoço.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial do TNF- α em induzir alterações morfométricas relacionadas a EMT;
- Caracterizar as alterações a nível de expressão gênica e de proteínas relacionadas a EMT, devido a estimulação com TNF- α ;
- Avaliar o potencial do TNF- α em induzir a migração celular;
- Avaliar a capacidade de microRNAs em modular aspectos fenotípicos relacionados a sobrevivência celular e EMT;
- Identificar alvos moleculares regulados por microRNAs, bem como as vias de sinalização a que pertencem;
- Avaliar o efeito do silenciamento da expressão gênica dos alvos preditos, sobre alterações fenotípicas relacionadas à sobrevivência celular e EMT.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo celular

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas células derivadas da linhagem humana imortalizada de HNSCC FADU (hipofaringe), concedidas pelo prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior. Para a realização da cultura celular, as células foram descongeladas e transferidas para tubos Falcon contendo meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL estreptomicina. Após a centrifugação e descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspenso em meio de cultura e as células transferidas a garrafas de cultura celular contendo meio de cultura. As garrafas de cultura celular foram armazenadas em uma incubadora de CO₂ umidificada, a 37 °C, havendo troca periódica do meio de cultura a cada dois dias. No momento em que a confluência das células atingiu aproximadamente 80%, as células foram dissociadas com o uso de uma solução de tripsina a 10%, submetidas a centrifugação a 1.100 RPM por 10 minutos em meio DMEM suplementado com 10% SBF, seguido de passagem para garrafas de cultura celular a densidade de 1×10^6 células em garrafas de cultura celular de 25cm². Alternativamente, foi realizada a criopreservação de células em criotubos (1×10^6 células/criotubo) contendo uma solução de congelamento específica (90% soro bovino fetal e 10% DMSO). Neste caso, os criotubos foram transferidos para um recipiente de congelamento comercial: CoolCell® LX (Biocision. San Francisco, EUA), armazenado em um freezer a -80 °C, por 24h, seguido da transferência dos criotubos para armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C). Durante o período de desenvolvimento deste trabalho, as células foram periodicamente observadas por microscopia óptica, no intuito de aferir a manutenção da morfologia celular (figura 10).

FIGURA 10 - Morfologia da linhagem celular FADU

FADU

Imagem de luz transmitida, com uso de uma objetiva de aumento de 10X, realizada em células derivadas da linhagem celular FADU.

3.2 Drogas, corantes e anticorpos utilizados

Durante toda a realização deste trabalho, células foram estimuladas com TNF- α recombinante (300-01a, PeproTech, EUA) ou mitomicina C (MMC, M4287, sigma-aldrich, EUA). Para marcação, foram utilizados os corantes nuclear: Hoechst 33342 (10 ug/mL; H1399, Thermo Scientific, EUA) e citoplasmático: HCS CellMask® Deep Red (5 ng/mL, H10294, Thermo Scientific, EUA). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados para imunofluorescência: Mouse anti-N-Cadherin IgG2ab mAb (SC-271386, Santa Cruz Biotechnology), Rabbit anti-SNAIL/SLUG (ab180714, abcam), Goat anti-Vimentin (sc-7558, Santa Cruz Biotechnology) e mouse-anti-Caspase-7 (sc-22179, Santa Cruz Biotechnology, EUA); bem como os seguintes anticorpos secundários: Goat anti-Rabbit DyLight 488 (35553, Thermo Scientific), Goat anti-Rabbit DyLight 594 (35561, Thermo Scientific), Goat anti-mouse DyLight 488 (35503, Thermo Scientific) e Donkey anti-Goat DyLight 594 (SA5-1088, Thermo Scientific).

3.3 Moléculas de RNA interferente

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas moléculas sintéticas de microRNA controle sem alvo específico “Pre-miR miRNA Precursor Negative Control #1” (PMC, #AM17110, Thermo Scientific). Adicionalmente, foram utilizadas moléculas miméticas de microRNAs humanos (Thermo Scientific) presentes na biblioteca de microRNAs do laboratório de biologia funcional (LFbio; Tabela 1).

Tabela 1 - Lista de moléculas miméticas de microRNA do LFBio

Molécula mimética	Número de catálogo
hsa-miR-17-3p	PM12246
hsa-miR-18a-5p	PM12973
hsa-miR-18b-5p	PM10466
hsa-miR-19a-3p	PM10649
hsa-miR-19b-3p	PM10629
hsa-miR-20a-5p	PM10057
hsa-miR-20b-5p	PM10975
hsa-miR-21-5p	PM10206
hsa-miR-22-3p	PM10203
hsa-miR-23a-3p	PM10644
hsa-miR-24-3p	PM10737
hsa-miR-27a-3p	PM10939
hsa-miR-29a-3p	PM12499
hsa-miR-29b-3p	PM10103
hsa-miR-30a-5p	PM11062
hsa-miR-92a-3p	PM10916
hsa-miR-101-3p	PM11414
hsa-miR-106a-5p	PM12567
hsa-miR-145-5p	PM11480
hsa-miR-181d-5p	PM12522
hsa-miR-222-3p	PM11376
hsa-miR-302a-3p	PM10936
hsa-miR-302a-5p	PM12557
hsa-miR-302b-3p	PM10081
hsa-miR-302b-5p	PM12916
hsa-miR-302c-3p	PM10571
hsa-miR-302d-3p	PM10927
hsa-miR-363-3p	PM10149
hsa-miR-371a-3p	PM12262
hsa-miR-372-3p	PM10165
hsa-miR-373-3p	PM11024

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas as moléculas comerciais de siRNA (Thermo Scientific) observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Lista de moléculas comerciais de siRNA utilizadas

SiRNA	Número de catálogo
Silencer Select Negative Control No1 (siCTR)	4390843
siGENOME human UBC siRNA (siUBC)	#M-019408-01
BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo (siFICT)	2013
Silencer Select AKT1	S660
Silencer Select CTNNB1	S438
Silencer Select GSK3B	S6241
Silencer Select RELA	S11914
Silencer Select SNAI1	S13186

3.4 Transfecção reversa

O processo de transfecção reversa é caracterizado pela formação de lipossomos contendo moléculas de RNA de interferência, seguido da incubação com uma suspensão celular. Durante a realização deste trabalho, os seguintes reagentes de transfecção foram utilizados: Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific, EUA), Lipofectamine LTX (Thermo Scientific, EUA) e siPORT NeoFX (Thermo Scientific, EUA). Em todo caso, os volumes referentes ao RNAi, reagente de transfecção e suspensão celular foram fixados na mesma proporção, variando em função do volume final de acordo com a placa de cultura celular utilizada. Portanto, em placas de 96 poços, o volume final de cada poço da placa de cultura foi estabelecido em 100 μL , sendo composto por 10 μL da solução de siRNA (concentração final = 10 nM), 10 μL da solução do reagente de transfecção e 80 μL de suspensão celular contendo 4×10^3 e $4,6 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 e 12 poços, respectivamente. De outro modo, em placas de 12 poços, o volume final foi estabelecido em 1150 μL , sendo composto por 115 μL da solução de siRNA, 115 μL da solução do reagente de transfecção e 920 μL da suspensão celular.

De um modo geral, ensaios de transfecção foram iniciados pela diluição, em meio Opti-MEM (31985070, Thermo Scientific), de moléculas de RNAi. Em todo ensaio, foram utilizadas moléculas controle, a exemplo de siRNAs (Silencer Select Negative Control No1) e miméticos de microRNAs sem alvo específico (PMC, Ambion, #AM17110), no intuito de controlar para efeitos inespecíficos oriundos da transfecção de moléculas de RNAi. Além disso, foram utilizadas também um pool de moléculas de siRNA citotóxicos específicos a transcritos de ubiquitinas (siUBC, siGENOME human UBC siRNA), no intuito de avaliar a eficiência da transfecção a partir da redução da quantidade de células. De todo modo, moléculas miméticas de microRNAs foram utilizadas a concentrações finais de 50 nM, enquanto moléculas sintéticas de siRNAs foram utilizadas a concentrações finais de 10 nM. Excepcionalmente, o siUBC foi utilizado a concentrações finais de 30 nM.

Após a diluição das moléculas, foi realizada a diluição do reagente de transfecção em meio Opti-MEM, seguido por um período de incubação de 5 minutos. Após este período, a solução contendo o reagente de transfecção foi adicionado à diluição de moléculas de RNAi, seguido por um período de incubação de 20 minutos, no intuito de proporcionar a formação de lipossomos contendo moléculas de RNAi. Finalmente, uma

suspensão celular, em meio DMEM suplementado com 10% SBF foi adicionada aos lipossomos.

3.5 Imunomarcção

A imunomarcção foi um procedimento utilizado na maioria dos ensaios realizados durante a realização deste trabalho. Para tanto, células foram fixadas e permeabilizadas a partir da incubação, por 15 minutos (a -20 °C), com uma solução gelada de formaldeído a 2% em metanol, seguido por duas lavagens em PBS. No intuito de neutralizar as ligações cruzadas (do inglês *crosslinking*) causadas pelo formaldeído, foi adicionado uma solução de glicina a 0,1 M, por 15 minutos a temperatura ambiente. Para bloquear as ligações inespecíficas, as células foram incubadas por 30 minutos com uma solução de SFB a 1% em PBS. Posteriormente, as células foram incubadas, por uma hora a temperatura ambiente, com anticorpos primários selecionados com base nos requisitos de cada ensaio. Após duas lavagens em PBS, as células foram incubadas, por 45 minutos e a temperatura ambiente, com uma solução contendo tanto corantes nuclear e citoplasmático, quanto anticorpos secundários selecionados com base nos anticorpos primários utilizados. Finalmente, as células foram lavadas por 2 vezes com PBS e dispostas no sistema HCS para aquisição e análise de imagens.

3.6 Aquisição e análise de imagens

Durante a realização deste trabalho, a aquisição de imagens foi realizada com uso do sistema de *High-Content Screening* (HCS): ImageXpress® Micro XLS (Molecular Devices, EUA). Esse sistema de HCS apresenta quatro diferentes objetivas de aumento: 4X, 10X, 20X e 40X, que podem ser combinadas com filtros de excitação/emissão: DAPI, FITC, Cy3, Texas Red e Cy5, além da luz transmitida (Figura 11). Em cada experimento, foram selecionados as objetivas e filtros mais apropriados, levando em conta os corantes e fluoróforos presentes em cada ensaio.

Figura 11 - O sistema de *High-Content Screening*: ImageXpress® Micro XLS

Aparelho de HCS (a esquerda) e cubos de filtros com seus respectivos espectros de excitação/emissão, bem como exemplos de fluoróforos compatíveis com cada filtro (a direita).

De um modo geral, a segmentação de imagens de imunofluorescência consiste na identificação de compartimentos celulares e proteínas de interesse com base na positividade (+) e negatividade (-) para marcação com diferentes corantes e anticorpos. A depender dos parâmetros morfométricos e relativos a expressão/localização de proteínas a serem mensurados em cada ensaio, a análise de imagens foi realizada com auxílio do *software* MetaXpress (Molecular Devices, EUA) ou CellProfiler (versão 2.2.0, Broad Institute, EUA). O *software* MetaXpress apresenta distintos “módulos de aplicação”, ou conjuntos de algoritmos formulados para atender as necessidades de diferentes procedimentos experimentais. De todo modo, nos diferentes ensaios analisados com auxílio do MetaXpress, foi utilizado o módulo *Cell Scoring*, capaz de segmentar compartimentos celulares (núcleo e citoplasma) com uso de até dois comprimentos de onda, bem como quantificar a presença de proteínas interesse com base em corantes e fluoróforos presentes em cada ensaio. Digno de nota, mesmo na ausência de um corante específico para o citoplasma, a presença/ausência de uma proteína de interesse neste mesmo compartimento pode ser avaliada devido a capacidade desse software em, a partir da segmentação nuclear, quantificar a presença de marcações extra nucleares, utilizando para isso, uma extrapolação da área nuclear baseada na própria marcação da proteína de interesse (Figura 12).

Figura 12 - Segmentação e análise de imagens realizada com auxílio do *software* MetaXpress, módulo Cell Scoring

Fotomicrografias de fluorescência derivadas de aquisições com uso de cubos com filtros DAPI (Hoechst) e FITC (Dy488) são utilizadas para identificação de núcleos positivos e negativos para o marcador utilizado.

O CellProfiler é um *software* desenvolvido especificamente para análises de imagens provenientes de ensaios de microscopia, e para tanto, apresenta algoritmos capazes de segmentar compartimentos celulares, bem como quantificar parâmetros morfométricos e relacionados a presença/localização de fluoróforos de interesse (CARPENTER et al., 2006). Adicionalmente, essa ferramenta permite a extração de metadados referentes ao ensaio a ser analisado, possibilitando por exemplo a identificação das condições experimentais (tratamentos, tempo de incubação, etc.) referentes a cada poço da placa de cultura celular. O CellProfiler é capaz de segmentar e analisar imagens a partir da montagem, realizada pelo próprio usuário, de uma *pipeline*, ou um grupo de algoritmos para análise de imagens agrupado de maneira hierárquica (Figura 13).

Figura 13 - Segmentação de imagens realizada com auxílio do *software* CellProfiler

Fotomicrografias de fluorescência derivadas de aquisições com uso de cubos com filtros DAPI (Hoechst) e Cy5 (Cell Mask Deep Red), são utilizadas para identificação de objetos primários (núcleo), secundários (célula) e terciário (citoplasma).

Os dados oriundos das análises de imagens realizadas com auxílio do CellProfiler foram processados com auxílio do *software* KNIME (versão 3.2.0, <https://www.knime.org>). O KNIME apresenta uma interface gráfica que possibilita a elaboração de uma *pipeline* composta por algoritmos responsáveis por processar ou visualizar dados. A grande capacidade dessa plataforma analítica no processamento de megadados (do inglês *big data*) faz do KNIME uma ferramenta valiosa no processamento de dados oriundos de experimentos em larga-escala (STROBELT et al., 2012).

3.7 Ensaios funcionais baseados em *high-content screening*

Durante a realização do presente trabalho foram conduzidos diversos ensaios funcionais baseados em *high-content screening*, no intuito, por exemplo, de caracterizar alterações fenotípicas relacionadas a EMT, estabelecer as condições ideais de transfecção, avaliar alterações fenotípicas multiparamétricas desencadeadas pela ação de moléculas miméticas de microRNAs e siRNAs, dentre outras. Para realização dos ensaios funcionais, células derivadas da linhagem FADU foram cultivadas em placas de cultura celular de 96 poços específicas para ensaios de imunofluorescência (CLS3603, Corning, EUA), a densidades de 3000 e 4000 células/poço, em condições experimentais de ausência e presença de reagentes de transfecção, respectivamente. De todo modo, os ensaios funcionais conduzidos durante a realização deste trabalho foram realizados em triplicatas experimentais. Quando necessário, após 24h de cultivo, as células foram estimuladas com TNF- α nas concentrações e períodos de incubação desejados em cada procedimento experimental. Posteriormente, as células foram sujeitas a imunomarcção, que foi realizada sempre com o uso do corante nuclear Hoechst, podendo ou não ser associado ao marcador citoplasmático CellMask Deep Red, anticorpos primários específicos a proteínas de interesse, bem como anticorpos secundários conjugados a fluoróforos. Para aquisição de imagens, com auxílio do sistema de HCS ImageXpress, foram adquiridas imagens referentes a nove campos por poço, com uso de uma objetiva de aumento de 10X e cubos com filtros de excitação/emissão adequados aos corantes e marcadores utilizados (uma imagem para cada filtro).

As imagens oriundas de ensaios funcionais que objetivaram avaliar somente a presença/ausência de corantes ou marcadores fluorescentes, foram analisados com auxílio do *software* MetaXpress. Essa ferramenta foi utilizada para encontrar o valor médio dos parâmetros avaliados, dentre as nove imagens adquiridas em cada poço. De outro modo,

foram analisadas com auxílio do *software* CellProfiler as imagens oriundas de ensaios funcionais que objetivaram avaliar múltiplos parâmetros morfométricos, bem como outros referentes à presença/ausência e localização de marcadores fluorescentes. De um modo geral, os resultados dessas análises foram processados pelo *software* KNIME, no intuito de encontrar o valor médio de cada parâmetro, por poço, de modo similar ao efetuado pelo software MetaXpress. De todo modo, os resultados das análises realizadas por com auxílio de diferentes ferramentas, foram utilizados para geração de gráficos comparativos dentre as diferentes condições experimentais, bem como realização de análises estatísticas.

3.8 Ensaios de migração celular

No intuito de mitigar interferências advindas da proliferação celular no ensaio de migração, inicialmente foi avaliado a capacidade da mitomicina C, um agente antimitótico (ALI; BRAUN, 2014), em modular a proliferação e morte celular. Para tanto, ensaios baseados em *high-content screening* foram realizados em células cultivadas tratadas com MMC, a concentrações de 0,01 a 5,0 µg/mL e por duas horas, seguido de incubação com meio de cultura celular por 48h. Excepcionalmente, anteriormente a incubação com MMC, células de um poço com foram marcadas com o corante nuclear *Hoechst* no intuito de determinar a quantidade de células inicial. Após 48h de cultivo, as demais células foram incubadas com o corante nuclear *Hoechst* e o marcador de mortalidade celular Iodeto de propídio (PI). Após a aquisição de imagens com uso do sistema de HCS, com auxílio do *software* MetaXpress, foi mensurada a quantidade média de células por poço, bem como a percentagem de células mortas.

Durante a realização de ensaios de migração celular, foram utilizadas placas de cultura especiais: Oris Pro Cell Migration Assay, 96 wells (Platypus Technologies, EUA). Resumidamente, essa placa contém um gel solúvel na região central dos poços, o que possibilita a formação de uma região livre de células no centro do poço após a adesão celular (Figura 14).

Figura 14 - Representação gráfica da formação da área livre de células com uso de placas de cultura Oris Pro

Representação do poço da placa de cultura, contendo o gel solúvel (em cinza). Representação do poço após a incubação com células, sedimentação de células e formação da área livre de células após a dissolução do gel. FONTE - <http://platypustech.com/cell-based-assays/oris-pro-cell-migration>, acesso em 01/05/2017.

Após o cultivo de células nas placas de migração, a densidades de 25000 células/poço, imagens de luz transmitida (uma imagem/poço) foram adquiridas utilizando uma objetiva de aumento de 4X, capaz de englobar todo o poço. Ao final do ensaio, as imagens foram exportadas para o *software* de análise de imagens CellProfiler. Para quantificar a migração celular, foi elaborado uma *pipeline* capaz de realizar sucessivas modificações nas imagens, no intuito de corrigir a distribuição da iluminação ao longo das imagens e evidenciar a área ocupada por células, que foi então segmentada e quantificada. De todo modo, em cada poço da placa de cultura, a taxa de migração celular foi quantificada com base no percentual de aumento na área ocupada por células em cada poço da placa de cultura celular, como expresso pela equação $M = (Af * 100 / Ai) - 100$, sendo M: Taxa de migração, Af: Área ocupada pelas células no tempo final e Ai: Área ocupada pelas células no tempo inicial.

3.9 Identificação de alvos preditos por microRNAs, com base em alterações fenotípicas multiparamétricas em comum

Com base nos resultados de análises morfométricas realizadas pelo software CellProfiler, em imagens oriundas de células transfectadas com moléculas miméticas de microRNAs humanos, o software KNIME foi utilizado primeiramente para calcular a porcentagem de variação das medidas em relação aos controles presentes na placa (pre-miR-Ctr). Em seguida, o valor mediano de cada parâmetro por poço foi calculado. O cálculo da mediana foi adotado no intuito de evitar possíveis influências de valores aberrantes (*outliers*) em determinadas imagens de um mesmo poço, o que poderia resultar em valores médios não-representativos acerca da população amostral. O conjunto de valores obtidos para os diferentes parâmetros morfométricos selecionados, relativos a cada microRNA, caracterizam o perfil fenotípico multiparamétrico induzido por cada um dos microRNAs. Posteriormente, tais dados foram analisados com auxílio do software

cluster 3 (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/>), com o objetivo de realizar a clusterização (do inglês *clusterization*) hierárquica dos microRNAs, com base nas similaridades das alterações fenotípicas multiparamétricas induzidas pelos microRNAs. O *software* Java TreeView (<http://jtreeview.sourceforge.net/>) foi utilizado para visualizar a clusterização gerada com auxílio do cluster 3, seguido da identificação de grupos de microRNAs miméticos que levaram a alterações fenotípicas de interesse.

Com auxílio do *software* KNIME, foi elaborada uma pipeline capaz de identificar os transcritos gênicos preditos na base de dados TargetScan (versão 7.1), em comum aos microRNAs previamente identificados. Com o uso da plataforma Venny (versão 2.1) foi possível identificar, com base na lista dos alvos moleculares preditos em comum a cada grupo de microRNA, aqueles exclusivos a cada grupo e também aqueles em comum a dois ou mais grupos. Finalmente, vias moleculares significativamente enriquecidas com os alvos preditos foram identificadas com o auxílio da plataforma Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (Figura 15) (DAVID, versão 6.7).

Figura 15 - Fluxograma ilustrativo da identificação de alvos preditos e vias moleculares reguladas por microRNAs

3.10 PCR quantitativo (qPCR)

Para realização do qPCR, células derivadas da linhagem FADU foram cultivadas em placas de cultura celular de 12 poços, em triplicatas experimentais e a densidades de $3,5 \times 10^4$ e $4,6 \times 10^4$ células/poço quando na ausência e presença de reagente de transfecção, respectivamente. Após 24h de incubação, quando necessário, as células foram estimuladas com TNF- α por um período de incubação de 48h. Ao final deste período, foi efetuada a extração de RNA e transcrição reversa (para geração do cDNA).

Para extração do RNA, as células foram lavadas com uma solução de PBS, sendo então ressuspensas inicialmente em 250 μ l de uma solução composta de PBS e DEPC (Dietilpirocarbonato; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) com a adição, em seguida, de 750 μ l de TRIZOL (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina –

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para completa homogeneização. As soluções foram então transferidas para tubos “eppendorf” e armazenadas a -80°C , até o momento da extração do RNA. Para extrair o RNA, as amostras foram descongeladas e em seguida foi adicionado 10 μl de glicogênio e 200 μl de clorofórmio, sendo então centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C . Em seguida, a fração aquosa superior contendo RNA foi transferida para novo tubo, com a adição de 500 μl de isopropanol gelado, por um período de incubação de 15 minutos a temperatura ambiente, no intuito de precipitar o material, que em seguida foi centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C , sendo descartado o sobrenadante.

Para a lavagem do pellet formado, ele foi ressuspensão em etanol 70% e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C , em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 15 μl de água livre de RNase, seguido do armazenamento a -80°C . O RNA total obtido das amostras foi quantificado no espectrofotômetro NanoVuePlus (GE Healthcare; Piscataway, NJ) através do comprimento de onda de 260nm, sendo utilizado a equivalência de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para 1 unidade de absorbância. O grau de pureza das amostras foi avaliado através da razão 260/280nm, sendo aceitáveis aquelas que apresentaram valores acima de 1,6.

O RNA extraído (1 μg de cada amostra) foi utilizado para síntese do cDNA, realizada por transcrição reversa, utilizando o kit High Capacity cDNA Archive Kit (AppliedBiosystems, Foster City, CA), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de cDNA resultantes desta reação foram diluídas em 10 μl , para uma concentração equivalente final de 100 ng/ μl em água livre de nucleases (Promega, Madison, WI, Estados Unidos da América), para então serem utilizadas em análises de expressão gênica através de ensaios de PCR quantitativo. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata (duas reações para cada amostra), com auxílio do sistema 7300 Real Time PCR System (AppliedBiosystems, Foster City, CA). Para tanto, foram utilizados o reagente Power SYBR®Green (AppliedBiosystems, Foster City, CA) e as amostras de cDNA (equivalente a 20ng, ou 2 μl de uma diluição 1/10 do cDNA) em conjunto com primers (0,8 μL) referentes a transcritos dos seguintes genes (Tabela 3):

Tabela 3 - Lista de *Primers* utilizados, sequência dos primers e temperatura de *melting* (TM)

Primer	Sequência	TM (°C)
CDH1	F: AGGAATTCTTGCTTTGCTAATTCTG R: CGAAGAAACAGCAAGAGCAGC	60
CDH2	F: CCCACACCCTGGAGACATTG R: GCCGCTTTAAGGCCCTCA	60
CTNNB1	F: TGGTTAAGCTCTTACACCCAC R: CACGAACAAGCAACTGAACTAG	62
GSK3B	F: GGTCTATCTTAATCTGGTGCTGG R: TGGATATAGGCTAAACTTCGGAAC	62
IL6	F: ATGCAATAACCACCCCTGAC R: GAGGTGCCCATGCTACATT	60
NFKB1	F: GAACCACACCCCTGCATATAG R: GCATTTTCCCAAGAGTCATCC	62
RELA	F: TGACAAGGTGCAGAAAGAGG R: CACATCAGCTTGCGAAAAGG	62
SNAIL1	F: GGAAGCCTAACTACAGCGAG R: CAGAGTCCCAGATGAGCATTG	62

As condições de termociclagem compreenderam uma incubação de 50°C por 2 minutos, em seguida 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), e por fim 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos), sendo os resultados de CT exportados para planilhas no software Excel, utilizando software Sequence Detection System V1.3. Com auxílio do software Microsoft Excell, os resultados dos ensaios de qPCR (CT) foram normalizados ao subtrair o valor do CT obtido daquele observado no controle endógeno GAPDH da mesma amostra (obtendo o valor de ΔC_t). O cálculo da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos genes foi obtido utilizando valores relativos ao grupo controle de cada procedimento experimental. Como um todo, os dados de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foram utilizados para avaliações do nível de expressão gênica e análises estatísticas.

3.11 Análises estatísticas

Os dados oriundos dos experimentos realizados durante a execução do presente trabalho foram analisados com o auxílio do *software* GraphPad Prism versão 5.0. De um modo geral, análises comparativas foram realizadas com uso do teste univariado “ONE-WAY Anova” com pós-teste de Tukey, para fins de comparação entre as médias de todos os grupos amostrais entre si. Em todo caso, a significância estatística foi considerada a $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação de alterações morfométricas induzidas pela ação do Fator de Necrose Tumoral α

Ensaio funcionais baseados em *high-content screening* foram realizados em células estimuladas com TNF- α , a diferentes concentrações e por diferentes períodos de incubação, no intuito de identificar a ocorrência de alterações morfométricas condizentes com a EMT. De um modo geral, foi observado que a estimulação por 48h com TNF- α levou a redução na quantidade de células e na percentagem de contato intercelular, bem como aumento na área celular. Além disso, tais alterações foram mais pronunciadas nas concentrações mais elevadas (20 e 50 ng/mL). Após 72h de estimulação com TNF- α , em comparação com ao período de 48h, foi observado uma acentuação na magnitude das alterações de todos os parâmetros avaliados. Além disso, diferentemente do observado no tempo de 48h, a estimulação com TNF- α também foi responsável por aumentar o formato fibroblástico das células (excentricidade). De modo similar ao observado no período de 48h, as alterações em parâmetros morfométricos após 72h de estimulação com TNF- α também foram mais acentuadas nas concentrações de 20 e 50 ng/ mL (Figura 16).

CellProfiler, diversos parâmetros morfométricos foram avaliados. **A.** Alterações em parâmetros morfométricos relacionados com a EMT, devido a estimulação com TNF- α por 48h ou 72h. **B.** Fotomicrografias de fluorescência representativas das diferentes condições experimentais. * = diferença estatisticamente significativa, em comparação com a condição controle, a $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.2 Avaliação de alterações na expressão de proteínas relacionadas com eventos de EMT, devido à ação do Fator de Necrose Tumoral alpha

Ensaio funcionais baseados em *high-content screening* foram realizados em células estimuladas com TNF- α , a diferentes concentrações e por diferentes períodos de incubação, no intuito de identificar alterações na expressão/localização de proteínas relevantes em eventos de EMT. Como resultados, observamos a estimulação com TNF- α por 48h levou ao aumento na positividade para N-Caderina citoplasmática, redução na positividade para Vimentina citoplasmática, bem como aumento na positividade para SNAIL/SLUG nuclear (com uso de um mesmo anticorpo contra SNAIL1 e SNAIL2). De modo geral, houve uma acentuação das alterações observadas de acordo com o aumento na concentração de TNF- α , em particular para SNAIL/SLUG, variando de cerca de 50% para cerca de 90%. Após 72h de estimulação, observamos a manutenção da positividade para N-Caderina dentre as condições experimentais de tratamento de 5 a 20ng/ml de TNF- α e um aumento na concentração de 50ng/ml, entretanto, houve também um aumento na percentagem de células positivas para esta proteína no grupo controle, de forma que só a concentração mais alta permaneceu estatisticamente significativa. Diferentemente do observado no tempo de 48h, foi observado um aumento na positividade para Vimentina, mais acentuado (e estatisticamente significativo) nas concentrações de 20 e 50 ng/mL. Além disso, observamos que em relação ao tempo de 48h, a positividade para SNAIL/SLUG foi reduzida pela metade no grupo controle (de 40 para 20%, aproximadamente) e em cerca de 30% nos grupos experimentais de tratamento com TNF- α (variando de cerca de 40% para cerca de 60%), resultando numa diferença estatisticamente significativa em todas as concentrações (Figura 17).

Figura 17 - Avaliação de alterações na expressão de proteínas relevantes em eventos de EMT, após estimulação com TNF- α

Células derivadas da linhagem FADU, estimuladas ou não (Controle) com TNF- α por 48h ou 72h, foram sujeitas a imunomarcção com corantes nuclear (Hoechst), anticorpos contra N-Caderina, Vimentina e SNAIL/SLUG (SN/SL). Com auxílio do sistema de HCS, imagens foram adquiridas com uso de uma objetiva de 10X e cubos com filtro de excitação/emissão DAPI (Hoechst), FITC (SN/SL) e Texas Red (T.Red; Vimentina). Com auxílio do *software* MetaXpress (módulo de análises *Cell Scoring*), foi mensurada a positividade para N-Caderina citoplasmática, Vimentina citoplasmática e SNAIL/SLUG

nuclear. **A.** Alterações na percentagem de células positiva para proteínas relacionadas com a EMT, devido a estimulação com TNF- α por 48h ou 72h. **B.** Fotomicrografias de fluorescência, representativas da presença e localização das proteínas avaliadas, sob as diferentes condições experimentais. * = diferença estatisticamente significativa, em comparação com a condição controle, a $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.3 Avaliação de alterações na migração celular devido à ação do Fator de Necrose Tumoral α

Inicialmente, a partir de ensaios funcionais baseados em *high-content screening*, buscou-se identificar a concentração de Mitomicina (MMC) capaz de inibir a proliferação celular sem interferir na mortalidade, após 48h de tratamento. Entretanto, apesar de nenhuma das concentrações avaliadas de MMC ter sido capaz de bloquear completamente a proliferação celular (comparado ao total de células contado no controle no tempo 0 – T0), nós observamos que em concentrações iguais ou superiores a 0,2 $\mu\text{g/mL}$, as células se portaram de forma muito parecida, com a inibição da proliferação atingindo seu ponto máximo (menor quantidade de células/campo) em relação ao controle sem MMC no tempo de 48h. Por outro lado, concentrações de MMC iguais ou superiores a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ induziram um aumento significativo na quantidade de células mortas (células PI+; Figura 18). Assim, selecionamos as concentrações de 0,2 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de MMC para os experimentos seguintes de migração celular.

Figura 18 - Avaliação da redução na proliferação celular causada por Mitomicina C

Células derivadas da linhagem celular FADU foram incubadas por 2h com diferentes concentrações de MMC, seguido de imunomarcagem no tempo inicial (T0) ou após 48h, com corantes nuclear (Hoechst) e de morte celular (PI). Com auxílio do sistema de HCS, imagens foram adquiridas com uso de uma objetiva de 10X e cubos com filtro de excitação/emissão DAPI (Hoechst) e Cy3 (PI). Com auxílio do *software* MetaXpress (módulo de análises *Cell Scoring*), foram quantificadas a quantidade média de células/campo e percentagem de célula mortas (PI+). Gráficos ilustrativos das alterações na quantidade média de células por campo no tempo inicial (T0) e após 48 de tratamento com MMC (a esquerda), além da percentagem de células mortas após 48 de tratamento com MMC (a direita). * = diferença estatisticamente significativa, em comparação com a condição controle, a $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Uma vez estabelecida a concentração de MMC ideal para realização do ensaio de migração, seguiu-se para a avaliação da capacidade do TNF- α em alterar a taxa de migração celular. Como resultados, foi observado que em comparação com as suas respectivas condições controle (ausência de TNF- α), o tratamento com TNF- α induziu significativamente a migração celular sob ambas as concentrações de mitomicina utilizadas. Entretanto, foi observado que a estimulação com TNF- α , a 20 ng/mL, foi capaz de induzir uma migração mais acentuada em comparação a concentração de 50 ng/mL. Portanto, a concentração de 20 ng/mL foi selecionada para a realização de ensaios posteriores (Figura 19).

Figura 19 - Avaliação do papel do TNF- α na migração celular

Células derivadas da linhagem celular FADU foram cultivadas por 24h, em placas de cultura específicas para ensaios de migração, seguido do tratamento com MMC por 2h e estimulação com TNF- α a diferentes concentrações. Com auxílio do sistema de HCS, uma imagem de luz transmitida por campo foi adquirida com uso de uma objetiva de aumento de 4X. Com auxílio do *software* CellProfiler, foi quantificada a taxa de migração celular com base no percentual de aumento da área ocupada por células, em cada poço da placa de cultura celular. **A.** Alterações no percentual de migração celular, devido a estimulação com TNF- α por 72h **B.** Fotomicrografias de luz transmitida, representativas das condições experimentais no tempo inicial (T0) e após 72h (T72). * = diferença estatisticamente significativa, em comparação com a condição controle, a $p < 0,05$.

4.4 Avaliação do papel do TNF- α na expressão de genes relacionados a EMT

Após a realização de ensaios de expressão gênica em células estimuladas com TNF- α por 48h, observamos que o tratamento com TNF- α foi capaz de induzir uma redução na expressão de *CDH1* (E-caderina), bem como um aumento na expressão de *CDH2* (N-Caderina) e de *SNAI1* (SNAIL), entretanto, tais efeitos tiveram magnitudes variadas entre as amostras, de modo que não foi observada significância estatística. Inesperadamente, a estimulação com TNF- α levou ao aumento na expressão de *GSK3B*, um gene relacionado a fosforilação e indução a degradação de SNAIL. Finalmente, em células estimuladas com TNF- α , foi observado um aumento significativo na expressão de *IL6* (Figura 20).

Figura 20 - Alterações no nível relativo de expressão gênica devido ao tratamento com TNF- α

Células derivadas da linhagem celular FADU foram cultivadas por 24h, seguido ou não (CTR) de estimulação com TNF- α (TNF- α), a 20 ng/mL. Após 48h, foi realizado o ensaio de qPCR utilizando primers específicos para transcritos de diversos genes. Os níveis de expressão gênica foram normalizados com base no valor médio de CT encontrado na condição “Controle”, gerando os dados de expressão relativa (Relative Expression). ** = Diferença estatisticamente significativas a $p < 0,01$.

4.5 Estabelecimento das condições ideais de transfecção

Ensaio funcionais baseados em *high-content screening* foram realizados em células transfectadas com uma combinação de diversos reagentes de transfecção e moléculas de siRNA controle marcadas com FITC (siFITC). Ainda, células foram incubadas com Opti-MEM contendo siFITC, na ausência do reagente de transfecção, de forma a controlar para a ligação inespecífica do siFITC. Após 72h de transfecção, a partir da segmentação de imagens, foram quantificadas a quantidade total de células (Hoechst+) e a percentagem de células transfectadas (Hoechst +, FITC+).

Como um todo, foi observado que o uso da lipofectamina 2000, em todas as concentrações utilizadas, levou a uma redução significativa da quantidade celular, mais acentuada em concentrações iguais ou superiores a 0,2 $\mu\text{L}/\text{poço}$. De outro modo, as lipofectamina LTX e SiPORT, apesar de ter sido observada uma tendência a redução na quantidade celular nas concentrações mais acentuadas, apenas na concentração mais elevada essa redução foi significativa. Adicionalmente, somente as lipofectaminas 2000 e LTX resultaram em uma percentagem satisfatória de células transfectadas, ou seja, de aproximadamente 70% nas concentrações mais elevadas (Figura 21).

Figura 21 - Seleção do reagente de transfecção

Células derivadas da linhagem FADU foram transfectadas com diferentes concentrações dos reagentes de transfecção: Lipofectamine® 2000, Lipofectamine® LTX e siPORT™ NeoFX™, associados ao siRNA-FITC. Alternativamente, células foram incubadas com siRNA-FITC (controle). Após 48h, as células foram imunomarcadas com o corante nuclear Hoechst. Com auxílio do sistema de HCS, imagens foram adquiridas com uso de uma objetiva de 10X e cubos com filtro de excitação/emissão DAPI (Hoechst) e FITC (siRNA-FITC). **A.** Alterações na quantidade de média de células por campo e percentagem de células FITC-positivas, dentre as diferentes condições de transfecção. **B.** Fotomicrografias de imunofluorescência, representativas das condições de transfecção: Lipofectamine® 2000 (0,2 $\mu\text{L}/\text{poço}$), Lipofectamine® LTX (0,2 $\mu\text{L}/\text{poço}$) e siPORT™ NeoFX™ (0,3 $\mu\text{L}/\text{poço}$). * = diferença estatisticamente significativa, em comparação com a condição controle, a $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Devido a observação de que a lipofectamina LTX, a 0,2 $\mu\text{L}/\text{poço}$, proporcionou uma menor redução da quantidade de células (menor citotoxicidade) aliado a uma maior percentagem de células contendo RNA interferente siFITC (maior eficiência de transfecção), tal condição experimental foi selecionada para a etapa de avaliação funcional da transfecção. A realização deste ensaio tem sua importância em observar,

indiretamente, a ocorrência da liberação e processamento da molécula de siRNA no interior das células transfectadas, a partir de efeitos fenotípicos esperados (no caso, a morte celular decorrente do *knockdown* generalizado de ubiquitinas, pelo siUBC). Para tanto, ensaios funcionais baseados em *high-content screening* foram realizados em células transfectadas com siRNAs sem alvo específico (siCTR) ou siUBC. Após 72h de transfecção, foi observado que em comparação a células transfectadas com siCTR, a transfecção com siUBC levou a uma mortalidade celular significativa, como indicado pela redução na quantidade de células, bem como pelo aumento significativo no número de células PI+. Como um todo, os dados referentes tanto a quantidade de células quanto a percentagem de células mortas, resultaram em uma eficiência de transfecção de aproximadamente 75%. Portanto, em todos os ensaios de transfecção posteriores, utilizamos 0,2 μ L de lipofectamina LTX/4000 células. (Figura 22).

Figura 22 - Avaliação funcional do protocolo de transfecção

Células derivadas da linhagem FADU foram transfectadas com Lipofectamine® LTX (0,2 μ L/poço), em associação com siCTR ou siUBC por 72h, seguido da imunomarcção com os corantes nuclear Hoechst e de morte-celular PI. Com auxílio do sistema de HCS, imagens foram adquiridas com uso de uma objetiva de 10X e cubos com filtro de excitação/emissão DAPI (Hoechst) e Cy3 (PI). **A.** Alterações na quantidade média de células/campo, % média de células PI-Positivas e eficiência de transfecção, devido a transfecção com Lipofectamine LTX em associação com siUBC. **B.** Fotomicrografias de fluorescência representativas das condições experimentais de transfecção com siCTR e siUBC. *** = Diferenças estatisticamente significativas a $p < 0,001$.

4.6 Avaliação do papel de microRNAs em alterações fenotípicas multiparamétricas relacionadas com a sobrevivência celular e EMT

Ensaio funcionais baseados em *high-content screening* foram conduzidos com base em células transfectadas com moléculas miméticas de microRNAs humanos do LFBio, além do PMC e estimuladas com TNF- α por 72h. Em seguida, foi realizada a clusterização dos microRNAs com base na similaridade/dissimilaridade de alterações nos múltiplos parâmetros fenotípicos avaliados.

Como resultados, observamos a ocorrência de três grupos de microRNAs (C1, C2 e C3), capazes de levar a alterações multiparamétricas similares. Durante a identificação de grupos de microRNAs com efeitos fenotípicos de interesse, foram considerados apenas o parâmetro relacionado com a sobrevivência celular “*count nuclei*”, bem como os seguintes parâmetros relacionados com a EMT: intensidade mediana nuclear de SNAIL/SLUG (*Nuclei_MedianIntensity_SNAIL_SLUG*), intensidade mediana citoplasmática de SNAIL/SLUG (*Cytoplasm_MedianIntensity_SNAIL_SLUG*) e excentricidade celular (*Cells_Eccentricity*). Com base nos parâmetros mencionados, o grupo C1 foi subdividido em C1a e C1b, devido aos mesmos apresentarem efeitos opostos quanto a sobrevivência celular. Em seguida, os grupos C1a, C1b, C2 e C3 foram classificados em pro/anti-proliferativo e/ou pro/anti-EMT, com base em alterações desencadeadas pelos seus microRNAs nos parâmetros mencionados. Entretanto, de maneira geral, foi observado uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de núcleos e parâmetros relacionados com a EMT, indicando a possibilidade de que a potencialização/inibição da EMT, em muitos casos, tenha ocorrido devido não a ação direta dos microRNAs, mas a alterações na quantidade de células e consequentemente em mecanismos inibitórios da EMT mediados por contato celular. Portanto, para evitar a classificação de grupos de microRNAs com efeito pro/anti-EMT em situações que a EMT foi possivelmente potencializada/inibida por alterações na quantidade de células, o efeito de microRNAs na EMT foi considerado somente nos grupos em que foi observado a potencialização/inibição tanto da sobrevivência celular quanto da EMT, uma vez que tais efeitos contrariam as alterações inversamente proporcionais esperadas entre a quantidade de células e a EMT. Tendo em vista o que foi dito, os grupos de microRNAs foram assim classificados: C1a: pró-proliferativo/pró-EMT, C1b: anti-proliferativo, C2: anti-proliferativo/anti-EMT, C3: pró-proliferativo. Digno de nota, apesar de ter sido observado o efeito de microRNAs do grupo C2 em inibir determinados parâmetros

relacionados a EMT, esse efeito foi considerado heterogêneo (Figura 23). Ainda, é importante destacar que apesar do grupo C1a não formar um cluster de fato, decidimos por considera-lo um grupo, uma vez que os microRNAs induziram características fenotípicas com propriedades biológicas similares; em especial, indução de proliferação e de expressão nuclear de SNAIL/SLUG, bem como de excentricidade. Eles provavelmente não foram agrupados num mesmo cluster por diferenças quanto à excentricidade do núcleo e da porcentagem de interação com outras células (“Number of Neighbors” e “Percentage Touching”).

Figura 23 - Grupos de microRNAs com base em alterações fenotípicas multiparamétricas

Células derivadas da linhagem FADU foram transfectadas com diversos microRNAs e tratadas com TNF- α (20 ng/mL) por 72h. Em seguida, as células foram imunomarcadas com corantes nuclear Hoechst, citoplasmático CellMask Deep Red e anticorpos contra SNAIL/SLUG (SN/SL). Com auxílio do sistema de HCS, imagens foram adquiridas com uso de uma objetiva de 10X e cubos com filtro de excitação/emissão DAPI (Hoechst), FITC (SN/SL) e Cy5 (CellMask). Com auxílio do *software* CellProfiler, foram avaliados diversos parâmetros morfométricos, relativos a sobrevivência celular e presença/localização de

SNAIL/SLUG. Os dados foram processados pelo *software* KNIME e com auxílio do *software* Cluster 3, os miméticos de microRNAs foram sujeitos a clusterização não supervisionada. **A.** *heatmap*, indicando os valores menores (em azul) ou maiores (em amarelo) em relação a distribuição de valores de cada parâmetro dentre os microRNAs avaliados. **B.** Fotomicrografias de fluorescência, representativas de células transfectadas com PMC e miméticos do miR-18b-5p, miR-222-3p, miR-372-3p e miR-302-3p.

4.7 Identificação de alvos responsáveis pelos efeitos fenotípicos multiparamétricos comuns aos grupos de microRNAs identificados

Com auxílio do *software* KNIME e da base de dados TargetScan (versão 7.1), foi realizada a identificação de alvos preditos em comum a cinco ou mais membros de C1a ou C2 (ambos com um total de 7 microRNAs, cada), três ou mais membros de C1b (total de 5 microRNAs) e dez ou mais membros de C3 (total de 12 microRNAs). Em seguida, as listas de alvos preditos de cada grupo foram sujeitas a análise através da ferramenta online Venny (versão 2.1), sendo gerado um diagrama de Venn demonstrando alvos exclusivos e compartilhados dentre os pares de grupos avaliados (Figura 24). Portanto, foram eliminados de análises posteriores os alvos preditos compartilhados entre os pares C1a (pró-proliferativo/pró-EMT) e C2 (anti-proliferativo/anti-EMT), bem como C1b (anti-proliferativo) e C3 (pró-proliferativo).

Figura 24 - Diagramas de Venn

Eliminação dos alvos em comum a grupos de microRNAs que levaram a alterações fenotípicas opostas C1a e C2, bem como C1b e C3 (“X” e vermelho). C1a: pró-proliferativo/pró-EMT, C1b: anti-proliferativo, C2: anti-proliferativo/anti-EMT, C3: pró-proliferativo.

Com auxílio da plataforma DAVID, foram identificadas as vias moleculares significativamente enriquecidas com os alvos preditos específicos de cada grupo de microRNA identificado (disponível no anexo B). Portanto, dentre as vias identificadas e com base na literatura científica atual, foram selecionadas aquelas que mais provavelmente estariam selecionadas com os efeitos observados. Deste modo, observamos que microRNAs do subgrupo C1a apresentam como alvos genes integrantes

de vias moleculares relacionadas a eventos de adesão focal, a exemplo de *ARHGAP5* (*Rho GTPase activating protein 5*; inibidor da reorganização de formação de fibra de stress) e *GSK3B*, além de elementos envolvidos na via MAPK, tais como *RAP1A* (Ras-Related Protein Rap-1a) e *MAPK8* (Ras-Related Protein Rap-1a; JNK1). Dentre os alvos preditos do subgrupo C1b, observamos a presença de elementos de vias inflamatórias e MAPK, a exemplo de *IKBKG* (Inhibitor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells; IKK-gamma), ativador da via NF- κ B, bem como *AKT2* e *AKT3*, *MAPK9* (JNK2) e *MAPK10* (JNK3). Quanto ao C2, estiveram dentre os alvos preditos elementos da via PI3K/AKT: *PIK3R3* (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3), *AKT2* e *AKT3*, da via NF- κ B: *IKBKG* e *RELA* e da via MAPK: *MAPK9* e *MAPK10*. Finalmente, foi observado que microRNAs integrantes de C3, apresentaram como alvos preditos, elementos responsáveis por induzir a apoptose, tais como *FAS* (Fas Cell Surface Death Receptor), *FASLG* (FasL; Fas Ligand), *TNFRSF10B* (Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily, Member 10, ou TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 2, TRAIL-R2; Figura 25).

Figura 25 - Vias moleculares enriquecidas com alvos preditos em comum a grupos de microRNAs

C1a

C1b

C2

Tendo em vista a possível ação de C1a, um grupo pró-proliferativo/pró-EMT, em regular a atividade de *GSK3B*, bem como a possibilidade de C2, um grupo com ação anti-proliferativo/anti-EMT, em silenciar a expressão de *RELA*, tal atividade foi avaliada por ensaios de expressão gênica. Para tanto, ensaios de qPCR foram realizados em células transfectadas com miméticos de microRNAs representantes dos grupos C1a e C2, seguido de tratamento com $\text{TNF-}\alpha$ por 48h. Como resultados, observamos que enquanto miméticos do miR-27a-3p levaram ao aumento na expressão de *RELA*, houve uma tendência a redução devido a transfecção com miméticos do miR-302a-3p e miR-372-3p. Interessantemente, houve uma redução significativa na expressão de *IL6* devido à ação de miméticos do miR-19a-5p, miR-302a-3p e miR-372-3p. De outro modo, a redução da expressão de *GSK3B* foi observada tanto em células transfectadas com miméticos de miRs tanto de C1a (hsa-miR-18a-5p) quanto de C2 (hsa-miR-29b-3p e hsa-miR-372-3p; Figura 26).

Figura 26 - Avaliação do silenciamento da expressão gênica de microRNAs com efeito pró e anti-proliferativo/EMT

Células derivadas da linhagem celular FADU foram transfectadas com PMC ou moléculas miméticas de microRNAs oriundas de C1a (hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-19a-3p e hsa-miR-27a-3p, em vermelho) e C2 (hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-302a-3p e hsa-miR-372-3p, em azul), seguido de estimulação com $\text{TNF-}\alpha$, a 20 ng/mL. Após 48h, foi realizado o ensaio de qPCR com uso de *primers* específicos a alvos preditos dos grupos C1a e C2. Os níveis de expressão gênica foram normalizados com base no valor médio de CT encontrado na condição de transfecção com PMC, gerando os dados de expressão relativa (*Relative Expression*). Alterações nos níveis relativos expressão gênica de *RELA*, *IL6* e *GSK3B*, devido a transfecção com miméticos de miRs dos grupos C1a e C2. * = diferença estatisticamente significativa, em comparação com a condição controle, a $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.8 Avaliação da eficiência de siRNAs no silenciamento da expressão gênica

Tendo em vista identificação de elementos de vias inflamatórias dentre os alvos preditos por grupos de microRNAs com potencial pró e antitumoral, com o objetivo de avaliar o papel específico de alguns destes alvos, utilizamos moléculas de siRNA. Inicialmente, no intuito de avaliar a eficácia das moléculas de siRNA utilizadas no

silenciamento da expressão gênica de seus alvos, foram realizados ensaios de qPCR em células transfectadas com siRNAs e estimuladas com TNF- α . Como resultados, observamos que a exceção do siRNA específico para *SNAI1*, todas as moléculas de RNA de silenciamento utilizadas causaram a redução significativa do nível de expressão gênica dos seus alvos específicos. Mais especificamente, em células transfectadas com siRNAs contra *RELA*, *AKT1* e *CTNNB1*, foi observada uma redução de seus alvos específicos em torno de 80%. De outro modo, a transfecção com siRNAs contra transcritos de *GSK3B* foi seguida de uma redução na expressão de seus transcritos-alvo em torno de 50% (Figura 27).

Figura 27 - Avaliação da eficácia de silenciamento da expressão gênica dos siRNAs utilizados

Células derivadas da linhagem celular FADU foram transfectadas com siRNA controle (siCTR) ou siRNAs específicos a *RELA*, *AKT1*, *GSK3B*, *CTNNB1* e *SNAI1* por 24h, seguido de estimulação com TNF- α , a 20 ng/mL. Após 48h, foi realizado o ensaio de qPCR utilizando *primers* específicos para alvos dos siRNAs utilizados. Os níveis de expressão gênica foram normalizados com base no valor médio de CT encontrado na condição de transfecção com siCTR, gerando os dados de expressão relativa (*Relative Expression*). Redução dos alvos específicos dos siRNAs utilizados. *** = Diferença estatisticamente significativas, em comparação com a condição controle, a $p < 0,001$.

4.9 Avaliação do papel de componentes de vias inflamatórias na sobrevivência celular e EMT

Tendo em vista identificação de elementos de vias inflamatórias dentre os alvos preditos por grupos de microRNAs com potencial pró e antitumoral, foi avaliado o papel destes mesmos componentes na sobrevivência celular e EMT. Para tanto, ensaios funcionais baseados em *high-content screening* foram realizados em células transfectadas com siRNAs e estimuladas com TNF- α por 72h.

Como resultados estatisticamente significativos, observamos que o silenciamento na expressão de *RELA* e também *GSK3B*, levou a redução na quantidade de células e quantidade de células vizinhas, bem como ao aumento na excentricidade celular. De outro

modo, o silenciamento na expressão de *AKT1* levou a uma redução na expressão de SNAIL/SLUG nuclear e citoplasmática, aumento na área celular, além de uma leve redução na quantidade de células (não significativa). Finalmente, observamos que o silenciamento de *CTNNB1* levou a uma redução na quantidade de células e quantidade de células vizinhas, aumento na área e excentricidade celulares, bem como uma redução na expressão de SNAIL/SLUG citoplasmática (Figura 28).

Figura 28 - O papel de componentes de vias inflamatórias na sobrevivência celular e EMT

Células derivadas da linhagem FADU foram transfectadas com siRNAs específicos a transcritos gênicos de *RELA*, *AKT1*, *GSK3B*, *CTNNB1*, além do siCTR, seguido do tratamento com $\text{TNF-}\alpha$ (20 ng/mL) e imunomarcagem com corantes nuclear Hoechst, citoplasmático CellMask Deep Red e anticorpos contra SNAIL/SLUG (SN/SL). Com auxílio do sistema de HCS, imagens foram adquiridas com uso de uma objetiva de 10X e cubos com filtro de excitação/emissão DAPI (Hoechst), FITC (SN/SL) e Cy5 (CellMask). Com auxílio do *software* CellProfiler, foram avaliados diversos parâmetros morfométricos, relativos a sobrevivência celular e presença/localização de SNAIL/SLUG. **A.** Alterações na quantidade de células (*count nuclei*), quantidade de células vizinhas (*Cells_NumberOfNeighbours*), área celular (*Cells Area*), excentricidade celular (*Cells eccentricity*), intensidade mediana de SNAIL/SLUG no núcleo (*Nuclei_MedianIntensity_SNSL*) e citoplasma (*Cyto_MedianIntensity_SNSL*), devido a ação de siRNAs. **B.**

Fotomicrografias de fluorescência, representativas de células transfectadas com siCTR, siRELA, siAKT1, siGSK3B e siCTNNB1. * = diferença estatisticamente significativa, em comparação com a condição controle, a $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.10 Avaliação do papel de componentes de vias inflamatórias na morte celular

De acordo com nossos resultados anteriores, observamos que em células tratadas com TNF- α , o silenciamento de componentes de diferentes vias inflamatórias resultou na redução da quantidade celular. Portanto, objetivamos avaliar se tais alterações na quantidade celular ocorrem mesmo na ausência do estímulo por essa citocina, e além disso, se os efeitos observados decorrem de alterações na mortalidade celular. Para tanto, ensaios baseados em imunofluorescência foram realizados em células transfectadas com siRNAs e estimuladas com TNF- α por diferentes períodos, com uso de anticorpos contra caspase-7 ativa, um marcador de morte celular por apoptose (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013). Como observado nos tempos de 24h e 48h, o silenciamento individual de todos os componentes de vias inflamatórias avaliados resultou em reduções na quantidade celular (Figura 8). Além disso, em ambos os tempos de tratamento observamos que concomitante à redução na quantidade celular, houve um aumento na quantidade de células em apoptose. Em relação às demais condições experimentais, esta indução a apoptose foi mais acentuada, além de estatisticamente significativa, após o silenciamento dos transcritos de *RELA* e *AKT1* (Figura 29).

Figura 29 - Alterações na morte celular devido ao silenciamento de componentes de vias inflamatórias

Células derivadas da linhagem FADU foram transfectadas com siRNAs contra transcritos gênicos de *RELA*, *AKT1*, *GSK3B*, *CTNNB1*, além de siRNA controle (siCTR) e siRNA citotóxico (siUBC), seguido de

imunomarcção com marcadores nuclear (*Hoechst*) e de morte celular (Caspase-7; Csp-7), após 24h ou 48h. Com auxílio do sistema de HCS, imagens de imunofluorescência foram adquiridas com uso de uma objetiva de aumento de 10X e filtros de excitação e emissão: DAPI (*Hoescht*) e FITC (*Csp-7*). Tais imagens foram analisadas com auxílio do *software* MetaXpress. **A.** Quantidade média de células/campo e células apoptóticas (Csp-7 +), após 24h ou 48h de transfecção com siRNAs. **B.** Fotomicrografias de imunofluorescência, representativas das imunomarcações com Hoechst (em azul) e Caspase-7 (em verde), dentre as diferentes condições experimentais após 24h de transfecção. * = diferença estatisticamente significativa, em comparação com a condição controle, a $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

Estudos realizados até o presente momento elucidaram uma associação entre o microambiente inflamatório e diversos aspectos clinicamente relevantes na biologia do câncer, a exemplo da iniciação/progressão tumoral, bem como o desenvolvimento de metástases (RAPOSO *et al.*, 2015). Nesse sentido, citocinas inflamatórias apresentam um papel crucial em promover a transição epitélio-mesenquimal, que por sua vez é capaz de induzir metástases e a geração de células-tronco cancerosas (MARIE-EGYPTIENNE *et al.*, 2013). Tendo em vista esse contexto, o presente estudo foi realizado no intuito de promover, através da abordagem de *High-Content Screening*, uma extensa caracterização das alterações fenotípicas desencadeadas pela ação de um conjunto de microRNAs, muitos deles envolvidos na inflamação e pluripotência, na regulação da EMT em células derivadas de uma linhagem de HNSCC sob estímulo inflamatório. Como um todo, buscou-se identificar microRNAs com efeitos sobre a sobrevivência celular e EMT, no intuito de apontar transcritos-alvo e vias moleculares com potencial terapêutico contra o HNSCC.

Inicialmente, foi realizada a caracterização das alterações morfométricas relacionadas com a EMT e decorrentes da estimulação com o TNF- α , em diferentes concentrações e tempos de incubação, no intuito de abranger possíveis interferências causadas por ambas as variáveis. Interessantemente, foi observado que a estimulação com essa citocina inflamatória, principalmente após 72h de incubação, foi capaz de levar à alterações acentuadas em parâmetros morfométricos relacionados a EMT. Tais efeitos estão associados a mecanismos conhecidamente envolvidos em eventos de EMT, tais como a reorganização do citoesqueleto e alterações na composição de proteínas responsáveis por determinar a polaridade celular, contribuindo para as alterações morfológicas e aumento de mobilidade observadas nesse ensaio (SCANLON *et al.*, 2013). Em linha com tais observações, em um estudo envolvendo a análise de alto conteúdo baseado em microscopia de fluorescência, realizado com células epiteliais mamárias induzidas a EMT a partir da superexpressão de *SNAIL*, foi observado que alterações morfométricas citoplasmáticas relacionadas a EMT somente puderam ser observadas após 48h de cultura celular, havendo então uma acentuação das alterações após 72h (LEGGETT *et al.*, 2016).

Dentre as alterações morfométricas avaliadas pelo presente trabalho, também foi observada uma redução significativa na quantidade de células no período de 72h de incubação, o que pode estar relacionado ao próprio direcionamento da atividade celular em direção a migração ao invés da proliferação. Embora não tenha sido avaliada a capacidade do TNF- α em

induzir apoptose, em um estudo conduzido com células derivadas da linhagem celular FADU, não foi observado alterações na morte celular mesmo após a estimulação com TNF- α a 100 ng/ml, o dobro da concentração máxima utilizada nesse estudo (HOU et al., 2013).

Em linha com os indícios morfométricos de ocorrência da EMT, foi encontrado um aumento significativo na expressão proteica dos reguladores mestres da EMT SNAIL/SLUG devido a estimulação com TNF- α , embora não tenha sido observado uma alteração significativa em termos de expressão gênica. Em conjunto, tais observações estão em linha com estudos anteriores indicando que o aumento da atividade de SNAIL, em eventos de EMT induzidos através da estimulação com TNF- α , decorre devido a modificações pós-transcricionais que atuam na sua estabilização e translocação nuclear, ao invés de um aumento dos seus níveis transcricionais (WANG, H.; FANG, R.; *et al.*, 2013; WANG, H.; WANG, H. S.; *et al.*, 2013). Interessantemente, em um realizado com células derivadas da linhagem celular FADU induzidas a EMT por estimulação do EGFR, também foi encontrado um aumento dos níveis proteicos, mas não transcricionais de SNAIL1 (HOLZ et al., 2011). Em relação a proteínas de adesão, foi encontrado um aumento significativo nos níveis proteicos de N-Caderina e Vimentina, principalmente nas maiores concentrações e período de incubação com TNF- α . Em linha com tais resultados, foi observado que a estimulação com TNF- α levou ao aumento nos níveis de expressão gênica de *CDH2*, o que pode estar relacionado ao aumento na atividade transcricional de SNAIL/SLUG, que por sua vez possivelmente atuou contribuindo para a redução, embora discreta, dos níveis transcricionais de *CHD1*.

Como etapa final da caracterização da indução à EMT pela estimulação com TNF- α , foi realizado um ensaio de migração que revelou a capacidade dessa citocina inflamatória, principalmente a 20 ng/mL, em induzir a migração celular. Digno de nota, apesar do tratamento com o agente anti-mitótico Mitomicina (MMC), foi observado um aumento na área ocupada por células mesmo no grupo controle, o que pode estar relacionado com a própria proliferação celular, uma vez que as concentrações de MMC utilizadas não foram capazes de inibir completamente a proliferação. Como um todo, os resultados dos ensaios funcionais e de expressão gênica revelaram diversas alterações envolvidas com eventos de EMT, formando a base para a realização dos ensaios posteriores, realizados no intuito de avaliar alterações fenotípicas decorrentes da ação de moléculas de RNA interferente, no sentido de potencializar ou inibir a EMT e sobrevivência celular.

Com a realização de ensaios funcionais baseados em *high-content screening* em células transfectadas com miRs e induzidas a EMT, foram identificados quatro grupos (C1a, C1b, C2

e C3) de miRs com base na similaridade/dissimilaridade de alterações fenotípicas multiparamétricas relacionadas a sobrevivência celular e EMT.

O grupo pró-proliferativo/pró-EMT C1a foi composto por miméticos de microRNAs tradicionalmente envolvidos com a iniciação/progressão tumoral. Dentre os integrantes desse grupo, estiveram miméticos de elementos do cluster miR-17-92, a exemplo do miR-18a e miR-19a, que estiveram relacionados com aumento da capacidade metastática e tamanho tumoral em um estudo realizado com tecidos neoplásicos derivados de ESCC (XU et al., 2014). Em um estudo conduzido com células derivadas de carcinoma de nasofaringe, foi encontrado que a transfecção com miméticos do miR-18b, oriundo do cluster miR-106a-363 e parálogo do cluster miR-17-92, levou a um aumento expressivo na capacidade proliferativa (YU, X. et al., 2013). Como integrante do grupo C1a também foi observada a presença do miR-21, um alvo transcricional da via NF- κ B envolvido na progressão tumoral e metástases em HNSCC de diferentes regiões anatômicas (WANG et al., 2017; YAN *et al.*, 2013). Recentemente, estudos funcionais conduzidos com células derivadas de linhagens celulares de HNSCC, sujeitas a repressão da atividade do miR-21 endógeno através do uso de moléculas antagonicas do miR-21 ou inibidores de STAT-3, observaram uma inibição significativa na capacidade migratória/invasiva (KOMATSU et al., 2016; WANG *et al.*, 2017). Interessantemente, o silenciamento da expressão do mir-21 endógeno, através da transfecção com uso de moléculas antagonicas em tumores xenográficos de carcinoma de células escamosas de língua, levou a uma redução expressiva do crescimento tumoral e aumento da quantidade de células apoptóticas (WANG et al., 2015). Adicionalmente, miméticos do microRNA-27 (membro de C1a), integrante do cluster miR-23a/24/27a, também levaram a alterações fenotípicas potencialmente pró-tumorais. A atividade do miR-27a na progressão tumoral no HNSCC ainda é uma questão controversa e possivelmente relacionada com diferenças nas bases moleculares de diferentes regiões anatômicas, tendo em vista que em comparação com tecidos saudáveis e queratinócitos normais, existem achados conflitantes acerca de sua sub/superexpressão em linhagens celulares e tecidos derivados de diferentes regiões anatômicas de HNSCC (LI et al., 2016; MANIKANDAN et al., 2016; VRANA et al., 2017; ZHU et al., 2014). Adicionalmente, estudos funcionais realizados com células derivadas de linhagens celulares de carcinoma de esôfago, sujeitas a expressão ectópica do miR-27a através da transfecção com moléculas miméticas ou uso de vetores recombinantes, apresentaram observações controversas acerca do seu papel em induzir/inibir a proliferação celular (JIANG; DUAN; ZHOU, 2015; WU et al., 2015), enquanto que a transfecção com miméticos deste microRNA em células derivadas de diferente linhagens de carcinoma de laringe resultou na indução a proliferação (TIAN et al., 2014). Também integrante

do grupo C1a, o miR-30a foi encontrado como subexpresso em diferentes estudos de expressão gênica em tecidos neoplásicos oriundos de carcinoma de células escamosas oral e de hipofaringe (KOSHIZUKA *et al.*, 2017). Em contraste com nossos resultados, estudos funcionais realizados em células oriundas de linhagens celulares derivadas de câncer gástrico e de pulmão, observaram que a transfecção com moléculas miméticas do miR-30a levou a inibição da transição epitélio mesenquimal, como visto pela redução na capacidade migratória, aumento na expressão de *CDH1* e também redução na expressão de *SNAIL* (KUMARSWAMY *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2016).

Diferentemente de integrantes do C1a, moléculas miméticas do C1b apresentaram um efeito anti-proliferativo, embora também se tenha observado uma acentuação de características indicativas de EMT. Interessantemente, este grupo foi integrado por miméticos do miR-101, de efeito supressor tumoral em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de cabeça e pescoço. Em diferentes estudos conduzidos com amostras teciduais oriundas de carcinomas de células escamosas orais e de laringe, foi observada uma expressão significativamente reduzida em relação a tecidos saudáveis adjacentes, além disso, pacientes com baixa expressão deste microRNA apresentaram uma sobrevida em cinco anos significativamente maior (LI, M. *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2016). Em linha com nossos resultados, em um estudo recente conduzido com células da linhagem FADU, foi observado que a transfecção com miméticos do miR-101 levou a uma redução expressiva da sobrevivência celular e também do potencial migratório/invasivo (HUI *et al.*, 2016). Adicionalmente, diferentes estudos conduzidos com células de linhagens oriundas de ESCC sujeitas à expressão ectópica do miR-22 (outro miR do grupo C1b), observaram uma redução na sobrevivência celular e também redução no potencial migratório e invasivo (QIU *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2014). Em contraste com nossos resultados, diferentes estudos realizados com células oriundas de linhagens celulares derivadas de OSCC observaram que a transfecção com miméticos do miR-222 aumentaram a sobrevivência celular através principalmente de mecanismos inibitórios da apoptose (JIANG, F. *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2011). Digno de nota, apesar do grupo C1b também ser integrado por miméticos do miR-17, integrante do cluster miR-17-92 e superexpresso em tecidos neoplásicos oriundos de ESCC, estudos funcionais conduzidos com células oriundas de diferentes linhagens celulares derivadas de ESCC e OSCC, observaram que a transfecção com vetores plasmidiais ou miméticos do miR-17/20a resultaram na inibição do potencial migratório/invasivo (CHANG *et al.*, 2013; JING *et al.*, 2016).

Miméticos do grupo C2 apresentaram atividade em inibir parâmetros relacionados tanto com a sobrevivência celular quanto EMT, embora nesta última os efeitos tenham sido variados

em termos da redução da excentricidade celular e presença de SNAIL/SLUG nuclear/citoplasmática. Nesse grupo estiveram presentes ambos os microRNAs da família miR-29, cujo papel supressor tumoral ou oncogênico ainda não está bem elucidado no contexto do câncer de cabeça e pescoço, tendo em vista achados conflitantes acerca da sua sub/superexpressão em amostras teciduais oriundas de OSCC (COUTINHO-CAMILLO et al., 2015; MANIKANDAN *et al.*, 2016; YANG et al., 2015). Importaneamente, em um estudo conduzido por Kinoshita e colaboradores, foi observado que a transfecção com os três elementos da família miR-29 em células derivadas da linhagem celular FADU, de maneira isolada, resultou na redução significativa da quantidade celular, bem como na migração e invasão celular (KINOSHITA et al., 2013). No presente estudo também foi observado que miméticos do miR-24 tiveram um potencial efeito antitumoral, em contraste com nossas próprias observações acerca do efeito de miméticos de outros elementos do cluster miR-23a/24/27a, e também com estudos anteriores que observaram uma maior expressão do miR-24 em tecidos neoplásicos oriundos de TSCC e ESCC, em comparação com tecidos saudáveis (DONG et al., 2015; ZHAO et al., 2016). Por outro lado, em linha com nossos achados, estudos envolvendo análises de expressão gênica e ensaios funcionais encontraram a subexpressão do miR-24 em tecidos neoplásicos oriundos de LSCC, em comparação com tecidos saudáveis, bem como sua atividade supressora tumoral em células oriundas de linhagens derivadas de LSCC (GUO et al., 2012; XU et al., 2015). Em conjunto, nossas observações acerca do miR-24 e de elementos da família miR-29, fornecem indícios adicionais acerca da heterogeneidade de funções de microRNAs dentre as diferentes regiões anatômicas do HNSCC, bem como indícios acerca da função de supressor tumoral destas moléculas no câncer de hipofaringe. Em contraste com estudos conduzidos anteriormente, os quais observaram uma superexpressão de elementos da família miR-372/373 em amostras teciduais oriundas de diferentes regiões anatômicas de HNSCC, bem como o papel funcional de miméticos destas moléculas em promover a proliferação e migração celular, no presente estudo foi observado que tais moléculas apresentaram um efeito em reduzir parâmetros associados a sobrevivência celular e EMT (LIU et al., 2016; TU et al., 2015; WENG et al., 2017).

Em linha com nossas observações acerca do efeito dos demais microRNAs dos grupos parálogos miR-17-92 e miR-106a-363, foi observado que miméticos do miR-20b, miR-92a, miR-106a, e miR-363 levaram ao aumento na proliferação celular, integrando o grupo C3. Digno de nota, tais resultados fornecem indícios inéditos acerca da atividade do miR-20b, miR-92a e miR-106a em células derivadas de carcinoma de hipofaringe. Em linha com nossos resultados, existem observações acerca da superexpressão do miR-106a em tecidos neoplásicos

oriundos de diferentes regiões anatômicas do HNSCC, bem como da associação entre seus níveis de expressão e mortalidade em pacientes com ESCC (BOSE; BROCKTON; DORT, 2013; HUANG et al., 2014). Em contraste com nossos resultados, existem observações acerca tanto da subexpressão do miR-363 em tecidos neoplásicos metastáticos oriundos de diferentes regiões anatômicas do HNSCC, bem como a atividade de miméticos do miR-363 em inibir a migração sem alterar a proliferação celular (CHAPMAN et al., 2015; SUN et al., 2013). Entretanto, recentemente foi observado por Lu e colaboradores que o aumento dos níveis endógenos do miR-363, induzidos através da infecção com o vírus do papiloma humano-16 (HPV-16) em células derivadas da linhagem FADU, resultou no aumento da capacidade proliferativa e migratória (LU et al., 2016). De modo inédito, observamos que miméticos do miR-23a induziram a proliferação em células derivadas de uma linhagem de carcinoma de hipofaringe. Interessantemente, a superexpressão do miR-23a foi observada em tecidos neoplásicos derivados de TSCC e LSCC, além de ter sido associada ao pior prognóstico (PENG et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Em nosso estudo, a maioria dos miméticos de integrantes do cluster miR-302-367 avaliados (miR-302b, miR-302c, miR-302d) também levou ao aumento na proliferação celular. Tradicionalmente, integrantes do cluster miR-302-367 se encontram superexpressos em células tronco embrionárias e células pluripotente-induzidas (IPs), onde promovem a manutenção da auto renovação e repressão da diferenciação celular ao integrar loops auto regulatórios envolvendo a participação de fatores de transcrição envolvidos na pluripotência (OCT4 e NANOG) (ADLAKHA; SETH, 2017). Até o presente momento, estudos de expressão gênica indicaram a superexpressão do cluster miR-302-367 esteve associado a malignidade em tumores de células germinativas (MURRAY; NICHOLSON; COLEMAN, 2015). No contexto do câncer de cabeça e pescoço, foi encontrada a superexpressão de miR-302a e miR-302b em células derivadas de HNSCC com características de CSC (BOURGUIGNON, 2016). Entretanto, em um estudo recente, os níveis de expressão do miR-302b foram similares tanto entre tecidos saudáveis e derivados de ESCC, quanto dentre tecidos com diferentes graus de malignidade (TABRIZI et al., 2015). Em conjunto, nossas observações indicam funções inéditas de elementos do cluster miR-302-367 na proliferação de células derivadas de carcinoma de hipofaringe, o que sugere futuras investigações acerca de mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos observados, a exemplo da regulação na atividade de fatores de transcrição envolvidos na pluripotência e geração de células similares a CSC.

Com o intuito de identificar os alvos moleculares possivelmente envolvidos nas alterações multiparamétricas em comum observadas nos diferentes grupos de microRNAs, com auxílio da base de dados TargetScan, foi realizada a identificação dos alvos preditos em comum

à maioria dos miméticos de microRNAs presentes em cada grupo. Essa abordagem foi tomada com a intenção de evitar a exclusão de alvos compartilhados pela maioria, mas não pela totalidade dos microRNAs presentes em um determinado grupo, o que resultaria na exclusão de alvos moleculares relevantes para os efeitos observados na maioria dos casos. Esta abordagem tem sua relevância destacada frente ao fato de que diferentes microRNAs podem modular uma mesma via de sinalização (ou processo biológico), co-alvejando alvos compartilhados ou, alternativamente, por meio da regulação de diferentes componentes da via (HAUSSER; ZAVOLAN, 2014). Entretanto, essa abordagem não garante que os alvos identificados sejam os responsáveis pelos efeitos observados, uma vez que outros microRNAs com efeitos biológicos distintos podem compartilhar os mesmos alvos. Uma vez identificados os transcritos alvo comuns a cada grupo de microRNAs, com o auxílio de diagramas de Venn, foram realizadas comparações entre os alvos em comum e exclusivos a grupos com efeitos fenotípicos opostos, sendo eles C1a/C3 e C1b/C2. Em seguida, foram excluídos de análises posteriores os alvos em comum aos grupos de efeitos opostos, em vista que os mesmos dificilmente estariam envolvidos nos efeitos fenotípicos observados.

Após a identificação de vias moleculares possivelmente associadas com os efeitos observados em cada grupo identificado, ensaios de expressão gênica e estudos funcionais foram realizados no intuito de avaliar a ocorrência do silenciamento gênico de alvos preditos, bem como seu papel em modular parâmetros de interesse em células sob estímulo inflamatório. Durante esses ensaios, foram escolhidos miméticos de microRNAs e alvos preditos dos grupos C1a e C2, devido aos seus efeitos opostos em inibir/potencializar parâmetros de interesse relacionados tanto a sobrevivência celular quanto a EMT, além dos mesmos apresentarem alvos preditos possivelmente envolvidos na interface entre inflamação e progressão tumoral. Digno de nota, tendo em vista a capacidade de microRNAs em regular a expressão de modo tanto direto quanto indireto (ao silenciar a expressão de genes envolvidos com a atividade de fatores de transcrição), ensaios de expressão gênica foram realizados em células transfectadas por um período de 72h, no intuito de possibilitar a avaliação da redução na expressão de genes modulados tanto de modo direto quanto indireto. Entretanto, apesar de potencialmente abranger um espectro maior de alterações na expressão gênica causada pela ação dos miméticos de microRNAs selecionados, tal abordagem limita a distinção entre alvos diretos e indiretos.

De um modo geral, foi observado que o conjunto de alvos preditos do grupo C1a (pró-proliferativo/pró-EMT) estava enriquecido para componentes de vias relacionadas a adesão focal, a exemplo de *GSK3B* e *ARHGAP5*, este último codante de RhoGAP, um inibidor de *Rho GTPase A* (RhoA). RhoA é integrante de uma família de Rho GTPases, proteínas responsáveis

pela transdução de sinais intracelulares envolvidas na regulação da migração celular, polarização e ciclo celular, a exemplo da ativação de *Mammalian Diaphanous-related* (mDia), que atua na formação de fibras de stress, além de ativar *Rho-associated protein kinase* (ROCK) e induzir a formação de filamentos contrácteis de actomiosina (ZEGERS; FRIEDL, 2014). Adicionalmente, RhoA apresenta uma alta atividade durante eventos mitóticos, nos quais possui um papel importante na modulação da dinâmica de montagem dos microtúbulos e formação de fibras do fuso, dentre outras atividades (CHIRCOP, 2014). Interessantemente, estudos observaram que em células oriundas de linhagens derivadas de TSCC e ESCC, o silenciamento de RHOA levou a redução na capacidade proliferativa e migratória *in vitro*, além de resultar na redução do crescimento tumoral e potencial metastático em modelos tumorais xenográficos (MA et al., 2012; YAN et al., 2014). Em linha com tais observações, a superativação de *RHOA*, induzida através da superexpressão de *deoxyhypusine synthase* (DHPS) em células oriundas de uma linhagem derivada de OSCC, resultou tanto no aumento na proliferação e migração *in vitro*, quanto no crescimento tumoral e potencial metastático *in vivo* (MURAMATSU et al., 2016). Em linha, em um estudo realizado com células derivadas da linhagem FADU, foi demonstrado o papel de RhoA em reduzir a atividade de inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDKI), de modo a promover a proliferação celular ao induzir a entrada na fase S do ciclo celular (CROUCHER et al., 2010). Assim, a inibição de RhoGAP pelos microRNAs do cluster C1a poderia contribuir para a atuação de RhoA, tanto na proliferação como na EMT.

O papel de GSK3- β na biologia do câncer ainda está sendo estabelecido pela comunidade científica, tendo em vista achados conflitantes acerca de seu papel oncogênico e supressor tumoral em diferentes tipos de câncer, o que provavelmente está relacionado à sua atividade em ativar/desativar diversos substratos proteicos que apresentam papéis distintos de acordo com o contexto celular (MCCUBREY et al., 2014). Independentemente, em linha com observações anteriores acerca do papel de GSK3- β em inibir a proliferação/migração celular, através de sua ação em regular p53, SNAIL1/2, beta-catenina e PTEN, dentre outras proteínas (MCCUBREY et al., 2017), nós encontramos que *GSK3B* foi um alvo em comum de microRNAs do grupo C1a. Entretanto, foi observado que os níveis de expressão gênica de *GSK3B* foram reduzidos pela ação de miméticos de microRNAs tanto do grupo C1a quanto de C2, sendo que neste último tal efeito possivelmente se deu de maneira indireta, uma vez que esse transcrito não foi encontrado dentre seus alvos preditos. No contexto do câncer de cabeça e pescoço, estudos realizados com células derivadas de linhagens celulares oriundas de diferentes regiões anatômicas, observaram o papel das vias PI3K/AKT e wnt/beta-catenina em reprimir a atividade de GSK3- β , o que esteve diretamente relacionado com o desenvolvimento de células

com características de CSC, bem como aumento no potencial replicativo e migratório (GEORGY et al., 2015; PACCEZ et al., 2015; SEINO *et al.*, 2016). Adicionalmente, estudos realizados com amostras tumorais de pacientes com câncer de células escamosas cervical e oral, observaram uma associação entre o aumento e redução dos níveis de GSK3- β nas formas inativas/ativas, respectivamente, e o desenvolvimento/progressão tumoral (MISHRA; NAGINI; RANA, 2015; RATH et al., 2015). No contexto do OSCC, foi observado o papel da forma inativa de GSK3- β em promover a transcrição de ciclina D1 e a proliferação celular, indicando um papel importante da forma inativa na potencialização de características de células cancerosas, embora os mecanismos moleculares inerentes a esta relação ainda não estejam devidamente esclarecidos (MISHRA *et al.*, 2015). Tais observações podem estar associadas aos nossos resultados acerca da redução acentuada na quantidade de células, bem como indução a apoptose, devido a ação de siRNAs que levaram ao silenciamento na expressão de *GSK3B*. Interessantemente, de acordo com nossos resultados, a transfecção com siRNAs contra *GSK3B*, juntamente à estimulação com TNF- α , não levou a alterações nos níveis nucleares de SNAIL1/2. Entretanto, estudos realizados com células derivadas de linhagens oriundas de diferentes tipos de câncer, observaram que apesar do silenciamento de *GSK3B* ter sido responsável pelo aumento nos níveis proteicos de SNAIL, esse efeito não foi observado em células estimuladas com TNF- α (WANG, H.; FANG, R.; *et al.*, 2013; WANG, H.; WANG, H. S.; *et al.*, 2013; WU et al., 2009). Como um dos possíveis efeitos secundários do silenciamento de *GSK3B*, existe a possibilidade do aumento dos níveis de beta-catenina terem contribuído para os efeitos observados em C1a ou mesmo C2. De acordo com nossos resultados, o silenciamento de *CTNNB1* levou a uma redução acentuada na sobrevivência celular, o que provavelmente esteve relacionado ao seu efeito pró-apoptótico, além disso, levou a alterações conflitantes em parâmetros relacionados com a EMT. Interessantemente, diferentes estudos realizados com amostras tumorais de OSCC, encontraram um aumento na atividade da via wnt/beta-catenina, devido ao silenciamento epigenético de antagonistas da via, inibição da atividade de GSK3- β e ação de microRNAs, bem como sua associação com a redução na sobrevida livre de doença e aumento na taxa de recidiva (SHIAH *et al.*, 2016). Em linha com nossas observações, estudos conduzidos com células derivadas de linhagens celulares, oriundas de diferentes regiões anatômicas de HNSCC, encontraram que o silenciamento de beta-catenina induziu a morte celular por apoptose (SHIAH et al., 2014). Somado às observações de estudos anteriores, nosso estudo fornece indícios acerca do papel da redução dos níveis de GSK3- β na potencialização da sobrevivência celular e EMT, com possível contribuição do aumento dos níveis de beta-catenina. Entretanto, também observamos uma possível necessidade de níveis basais de GSK3-

β para a sobrevivência celular. Como um todo, nosso estudo indica a necessidade de investigações mais aprofundadas acerca da relação e entre a magnitude/dinâmica temporal do silenciamento de GSK3- β e seus efeitos na modulação de características de células tumorais no HNSCC.

Diferentemente do observado no grupo pró-proliferativo/pró-EMT C1a, muitos dos alvos preditos de miméticos tanto do grupo anti-proliferativo/anti-EMT C2, quanto do grupo anti-proliferativo C1b, integraram vias moleculares relacionadas com a interface entre inflamação e iniciação/progressão tumoral, a exemplo de elementos das vias PI3K/AKT e NF- κ B. A família AKT é constituída pelos genes homólogos *AKT1*, *AKT2* e *AKT3*, que codificam proteínas isoformas com mais de 80% de similaridade na sua estrutura primária, além de uma arquitetura comum, incluindo a subunidade catalítica, o que indica uma similaridade de funções (CALLEJA; LAGUERRE; LARIJANI, 2012). Apesar das similaridades, as diferentes isoformas de AKT apresentam uma participação seletiva em diferentes processos biológicos, o que é determinado em parte através da expressão tecido-específica e diferentes domínios regulatórios (TOKER; MARMIROLI, 2014). De um modo geral, estudos realizados até o momento demonstraram que enquanto a expressão de *AKT1* e *AKT2* ocorre de modo ubíquo, *AKT3* é encontrado predominantemente no cérebro, coração e rins (MARTELLI et al., 2012). Portanto, dentre os genes homólogos preditos como alvos do grupo C2, provavelmente *AKT2* está envolvido nos efeitos fenotípicos observados pela ação de miméticos de microRNAs. Em nosso estudo, apesar de ter sido efetuado o silenciamento da expressão gênica de *AKT1*, os efeitos funcionais observados provavelmente estão relacionados a uma redução nos níveis totais de AKT (codificados tanto por *AKT1* quanto por *AKT2*), em vista da homologia de estrutura e função de ambas as proteínas. Entretanto, seria necessário o silenciamento de *AKT2*, bem como a mensuração dos seus níveis de expressão após a ação de miméticos de microRNAs, para que uma relação direta pudesse ser estabelecida entre a redução de seus níveis e os efeitos fenotípicos observados.

No contexto do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, estudos clínicos conduzidos com pacientes com a doença manifestada em diferentes regiões anatômicas, foi encontrada uma associação entre polimorfismos em *AKT1*, *AKT2* e diferenças na progressão da doença e resposta a terapia (GUO et al., 2015; PFISTERER et al., 2015). Interessantemente, o silenciamento de *AKT1* em células derivadas de uma linhagem de OSCC, levou a redução no crescimento tumoral em um modelo tumoral xenográfico (NAKASHIRO et al., 2015). Em linha com nossos resultados, em um estudo realizado com células derivadas de linhagens celulares oriundas de HNSCC, incluindo FADU, foi observado que o tratamento com um inibidor

alostérico de AKT levou à redução na quantidade celular e capacidade migratória/invasiva, bem como uma indução da apoptose (KNOWLES et al., 2011). Em conjunto com observações anteriores, nossos resultados indicam o potencial terapêutico do silenciamento de *AKT1*, e possivelmente *AKT2*, em vista da sua ação em reduzir a quantidade de células através da indução a apoptose, bem como os níveis nucleares e citoplasmáticos de SNAIL/SLUG, o que pode estar associado a uma redução na capacidade das células em entrar em EMT, e consequentemente, levar a formação de metástases.

Em linha com observações anteriores acerca do papel da via NF- κ B na iniciação/progressão tumoral no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, observamos que *RELA* (codante de p65) esteve dentre os alvos preditos do grupo antitumoral. Interessantemente, observamos uma redução nos níveis de *RELA* em células transfectadas com miméticos do miR-302a-3p e miR-372-3p, o que também levou a uma redução acentuada na expressão de *IL6*, indicando a ação destas moléculas em inibir a atividade de NF- κ B. Individualmente, o silenciamento de *RELA* levou a uma acentuada redução na sobrevivência celular, o que pode ser atribuído à ação de *RELA* em contrapor a apoptose. Entretanto, em células sujeitas ao silenciamento de *RELA*, não foram observadas alterações na expressão de SNAIL/SLUG, bem como um aumento na área/excentricidade celular, o que pode resultar da incapacidade do silenciamento de *RELA*, isoladamente, em mitigar os efeitos indutores da EMT resultantes de mecanismos mediados pela ausência de contato celular. Em linha com nossos resultados, em um estudo conduzido com linhagens celulares derivadas de ESCC, foi observado que tanto o silenciamento na expressão de *RELA* quanto o tratamento com curcumina, um agente anti-inflamatório, foi capaz de induzir a apoptose *in vitro*, além de levar a redução no volume tumoral em tumores xenográficos realizados em modelos murinos (TIAN et al., 2012). Além disso, em um estudo conduzido com linhagens celulares oriundas de diferentes regiões anatômicas de HNSCC, bem como queratinócitos normais, a superexpressão ectópica de P65 induziu a EMT somente naquelas que não apresentaram mutações de perda de função em P53, enquanto que o silenciamento de P65 promoveu a EMT naquelas mutantes para P53 (LIN et al., 2015). Digno de nota, recentemente foi observado que mutações do tipo R248L no gene P53, apresentadas por células derivadas da linhagem FADU, não são capazes de inibir completamente as funções desta proteína (LI, X. et al., 2015). Em conjunto com observações realizadas por estudos anteriores, nossos resultados indicam que P65 apresenta um papel importante na sobrevivência celular no câncer de hipofaringe, podendo ser utilizado como um potencial alvo terapêutico.

Digno de nota, de modo similar ao observado no grupo anti-proliferativo/anti-EMT C2, miRs do grupo pró-proliferativo C3 também apresentaram, como alvos preditos, muitos elementos da via de sinalização por receptores do tipo Toll (anexo B). Entretanto, diferentemente de C2, em que foram alvejados alvos em comum com a sinalização por citocinas inflamatórias, a exemplo de TNF- α , os alvos de C3 estiveram limitados a genes codantes do receptor do tipo-Toll 4, bem como elementos a *downstream* específicos desta via (dados não ilustrados), o que pouco provavelmente teve alguma influência na potencialização da proliferação celular apresentada por microRNAs deste mesmo grupo. Inesperadamente, também foi observado a presença de elementos de vias de sinalização MAPK dentre os alvos preditos de C3. Neste contexto, aparentemente os alvos de C3 tiveram um duplo papel em por um lado inibir a proliferação através do silenciamento de elementos envolvidos com a via Ras, mas ao mesmo tempo potencializar a sobrevivência celular ao inibir elementos envolvidos com a indução de apoptose através da sinalização pela via MAPK (dados não ilustrados). Interessantemente, dentre os alvos preditos de C3, não foram encontrados elementos envolvidos na ativação da via NF- κ B por meio da sinalização pela via MAPK, o que reforça nossas observações acerca do papel central da via NF- κ B na sobrevivência celular do HNSCC. Como um todo, tendo em vista o efeito pró-proliferativo de C3, provavelmente os efeitos anti-apoptóticos dos microRNAs desse grupo foram determinantes em promover um aumento na quantidade de células.

Dentre os alvos preditos do grupo C3 relacionados com a apoptose, foram encontrados genes codantes de FasL e dos reguladores de morte (DRs, do inglês “Death Receptors”) Fas e TRAIL-R2. Em conjunto, o papel destas proteínas em células tumorais ainda é um campo de ampla investigação, tendo em vista a possibilidade destes receptores atuarem como amplificadores da inflamação ao invés de indutores da apoptose, potencializando a sobrevivência celular e geração de metástases a depender do contexto celular (CULLEN; MARTIN, 2015). De acordo com o modo canônico de sinalização, a estimulação dos DRs estimula a sua montagem na forma do complexo sinalizador indutor da apoptose (DISC), desencadeando uma cascata de sinalização envolvendo a ativação do apoptossomo e consequentemente de caspases executoras, culminando com a morte celular por apoptose (BRINT; O'CALLAGHAN; HOUSTON, 2013; VON KARSTEDT; MONTINARO; WALCZAK, 2017). Dentre esses receptores, TRAIL-R2 (DR-5) é um dos membros de uma família de receptores de ligantes indutores de apoptose relacionados a TNF (TRAIL-Rs), que juntamente com TRAIL-R1 (DR-4), são responsáveis por induzir apoptose em diferentes contextos celulares (VON KARSTEDT *et al.*, 2017). Interessantemente, em um estudo conduzido com diversas

linhagens derivadas de OSCC, a estimulação com TRAIL recombinante foi capaz de induzir a apoptose, mais especificamente a partir da sua ligação com TRAIL-2 (DR-5), em células que expressam *RAS* constitutivamente, indicando o potencial terapêutico advindo da manipulação de TRAIL-2 em determinados contextos celulares (CHEN, J. J. et al., 2013). No contexto do câncer de cabeça e pescoço, foi observado que uma menor expressão de Fas esteve relacionada com o pior prognóstico em diferentes regiões anatômicas, a exemplo do esôfago, faringe e região oral, estando envolvido por exemplo, em estágios tumorais mais avançados, metástases de linfonodos e redução do período de sobrevida livre da doença (ASENSIO et al., 2007; DE CARVALHO-NETO et al., 2013). Entretanto, estudos realizados com tecidos neoplásicos derivados de OSCC e ESCC, observaram uma associação entre a alta expressão de FasL e o mal prognóstico (DE CARVALHO-NETO *et al.*, 2013; SAIGUSA et al., 2015). Interessantemente, um estudo recente observou que a incubação com anticorpos humanizados contendo a região citotóxica de FasL foi capaz de induzir a morte-celular em células derivadas de OSCC, indicando o potencial terapêutico desse ligante (CHIEN et al., 2017). Em conjunto, nossos resultados indicam que microRNAs relacionados com a pluripotência podem exercer um efeito pró-proliferativo em células derivadas de carcinoma de hipofaringe, a partir da redução na expressão dos receptores de morte, necessitando ainda ser investigado a influência ou não da presença de vias de sinalização relacionadas com a pluripotência.

Embora o presente trabalho tenha gerado uma grande quantidade de novas informações, além de corroborar (ou contrapor) estudos prévios, o mesmo apresenta diversas limitações que necessitam ser abordadas. Como principal limitação deste estudo, se encontra a utilização de apenas uma linhagem celular como modelo de EMT e identificação de microRNAs/vias moleculares com potencial efeito pro/antitumoral, o que limita a capacidade de extrapolação dos resultados observados para carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço oriundas de demais regiões anatômicas. Entretanto, com base na literatura científica atual, foi observado que muitos dos efeitos encontrados com a modulação de vias moleculares observadas no presente estudo, levaram a resultados semelhantes em HNSCC de diferentes regiões anatômicas. Digno de nota, apesar de terem sido observados o papel de microRNAs/vias moleculares em potencializar tanto a proliferação celular quanto a EMT, não foram encontradas moléculas capazes de resultar em inibições acentuadas e homogêneas em ambos os parâmetros, de modo que ainda se faz necessário um estudo mais aprofundado acerca do papel de microRNAs e vias moleculares do grupo anti-proliferativo/anti-EMT, no sentido de melhor caracterizar as suas alterações em parâmetros relacionados com a EMT. Finalmente, apesar de ter sido observada uma correlação entre diversos parâmetros morfológicos indicadores da

EMT e a expressão/localização nuclear dos reguladores mestres SNAIL/SLUG, devido a não termos observado o silenciamento da expressão gênica de *SNAIL* após a transfecção com siRNA específico a este mesmo gene, não foi realizada uma avaliação de causalidade que poderia demonstrar o papel central ou não desse fator de transcrição no nosso modelo de EMT.

Como um todo, o presente trabalho ilustrou a capacidade da abordagem de *High-Content Screening* em identificar alterações fenotípicas e multiparamétricas relacionadas com a sobrevivência celular e EMT. Digno de nota, nossos resultados reforçaram e contrastaram observações realizadas por estudos anteriores, além de fornecer novas observações acerca do papel de diversos microRNAs, muitos deles associados a inflamação e pluripotência, em modular sobrevivência celular e EMT. De modo contundente, foi observado que a inibição das vias PI3K/AKT e NF- κ B foi relacionada com a redução na sobrevivência celular e indução à morte celular, o que em conjunto com resultados oriundos de estudos anteriores, indicam o potencial terapêutico do silenciamento destas vias no câncer de cabeça e pescoço.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo nós demonstramos que o uso de uma abordagem de microscopia quantitativa automatizada (*High-Content Screening*) permitiu a identificação de microRNAs com efeitos fenotípicos similares (no contexto de proliferação e Transição-Epitélio-Mesenquimal), e além disso, a predição de alvos compartilhados por estes microRNAs levou à identificação de alvos e vias de sinalização relevantes do ponto de vista terapêutico.

Como principais contribuições do presente estudo, observamos que:

- A abordagem de *High-Content Screening* é capaz de identificar a modulação de parâmetros relacionados com a sobrevivência celular e EMT, desencadeadas pela estimulação com indutores de EMT, bem como pela ação de microRNAs e siRNAs;
- A estimulação com o fator de necrose tumoral alfa é capaz de induzir a transição epitélio-mesenquimal em células derivadas de HNSCC FADU, em vista a indução ao aumento do aspecto fibroblástico, aumento na expressão de SNAIL/SLUG, bem como no potencial de migração celular;
- MicroRNAs envolvidos com o microambiente inflamatório e pluripotência são capazes de alterar aspectos fenotípicos relacionados a sobrevivência celular e EMT, a partir da modulação de diferentes vias moleculares;
- Moléculas miméticas de microRNAs que induziram a proliferação celular e EMT, apresentam como alvos preditos elementos relacionados com o remodelamento do citoesqueleto, e provavelmente, induz a ativação de vias reguladas por GSK3- β ;
- Moléculas miméticas de microRNAs que reprimiram a EMT e/ou proliferação celular, apresentam como alvos preditos elementos relacionados com vias tradicionalmente envolvidas na iniciação/progressão tumoral no HNSCC, além da via inflamatória NF- κ B;
- Moléculas miméticas de microRNAs envolvidas com a pluripotência induziram a proliferação celular e apresentam, como alvos preditos, diversos elementos indutores de apoptose;
- O silenciamento na expressão gênica de componentes relacionados com o microambiente inflamatório, envolvidos em vias moleculares preditas por microRNAs com potencial anti-EMT e/ou anti-proliferativo, leva a morte celular por apoptose.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS ¹

- ADLAKHA, Y. K.; SETH, P. The expanding horizon of MicroRNAs in cellular reprogramming. **Prog Neurobiol**, v. 148, p. 21-39, Jan 2017.
- AGARWAL, V. et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **Elife**, v. 4, Aug 12 2015.
- ALI, I.; BRAUN, D. P. Resveratrol enhances mitomycin C-mediated suppression of human colorectal cancer cell proliferation by up-regulation of p21WAF1/CIP1. **Anticancer Res**, v. 34, n. 10, p. 5439-46, Oct 2014.
- ALLEN, C. T. et al. Emerging insights into head and neck cancer metastasis. **Head Neck**, v. 35, n. 11, p. 1669-78, Nov 2013.
- ASENSIO, C. et al. Fas expression is associated with a better prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Anticancer Res**, v. 27, n. 6B, p. 4083-6, Nov-Dec 2007.
- ATTISANO, L.; WRANA, J. L. Signal integration in TGF-beta, WNT, and Hippo pathways. **F1000Prime Rep**, v. 5, p. 17, 2013.
- BAEISSA, H. M. et al. Mutational patterns in oncogenes and tumour suppressors. **Biochem Soc Trans**, v. 44, n. 3, p. 925-31, Jun 15 2016.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 23 2004.
- BAXI, S. S.; SHER, D. J.; PFISTER, D. G. Value considerations in the treatment of head and neck cancer: radiation, chemotherapy, and supportive care. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, p. e296-303, 2014.
- BHAT, S. S.; JARMOLOWSKI, A.; SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z. MicroRNA biogenesis: Epigenetic modifications as another layer of complexity in the microRNA expression regulation. **Acta Biochim Pol**, v. 63, n. 4, p. 717-723, 2016.
- BHINDER, B. et al. Chemical & RNAi screening at MSKCC: a collaborative platform to discover & repurpose drugs to fight disease. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 17, n. 4, p. 298-318, May 2014.
- BICKLE, M. The beautiful cell: high-content screening in drug discovery. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, n. 1, p. 219-26, Sep 2010.
- BOETTCHER, M. et al. High throughput synthetic lethality screen reveals a tumorigenic role of adenylate cyclase in fumarate hydratase-deficient cancer cells. **BMC Genomics**, v. 15, p. 158, 2014.
- BOSE, P.; BROCKTON, N. T.; DORT, J. C. Head and neck cancer: from anatomy to biology. **Int J Cancer**, v. 133, n. 9, p. 2013-23, Nov 2013.

¹ De acordo com a ABNT NBR 6023 2002.

BOURGUIGNON, L. Y. Matrix Hyaluronan Promotes Specific MicroRNA Upregulation Leading to Drug Resistance and Tumor Progression. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 4, p. 517, Apr 07 2016.

BOUTROS, M.; HEIGWER, F.; LAUFER, C. Microscopy-Based High-Content Screening. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1314-25, Dec 03 2015.

BRACKEN, C. P.; SCOTT, H. S.; GOODALL, G. J. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. **Nat Rev Genet**, v. 17, n. 12, p. 719-732, Dec 2016.

BRINT, E.; O'CALLAGHAN, G.; HOUSTON, A. Life in the Fas lane: differential outcomes of Fas signaling. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 21, p. 4085-99, Nov 2013.

BUCKLEY, L. et al. Oropharyngeal cancer and human papilloma virus: evolving diagnostic and management paradigms. **ANZ J Surg**, Dec 21 2015.

CALLEJA, V.; LAGUERRE, M.; LARIJANI, B. Role of the C-terminal regulatory domain in the allosteric inhibition of PKB/Akt. **Adv Biol Regul**, v. 52, n. 1, p. 46-57, Jan 2012.

CARPENTER, A. E. et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. **Genome Biol**, v. 7, n. 10, p. R100, 2006.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563-72, Aug 2002.

CHANG, C. C. et al. MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 49, n. 9, p. 923-31, Sep 2013.

CHAPMAN, B. V. et al. MicroRNA-363 targets myosin 1B to reduce cellular migration in head and neck cancer. **BMC Cancer**, v. 15, p. 861, 2015.

CHEN, C. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem(-like) cells in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Lett**, v. 338, n. 1, p. 47-56, Sep 10 2013.

CHEN, J. J. et al. TRAIL induces apoptosis in oral squamous carcinoma cells--a crosstalk with oncogenic Ras regulated cell surface expression of death receptor 5. **Oncotarget**, v. 4, n. 2, p. 206-17, Feb 2013.

CHIEN, M. H. et al. A Fas ligand (FasL)-fused humanized antibody against tumor-associated glycoprotein 72 selectively exhibits the cytotoxic effect against oral cancer cells with a low FasL/Fas ratio. **Mol Cancer Ther**, Mar 14 2017.

CHIRCOP, M. Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. **Small GTPases**, v. 5, 2014.

CHURG, A. et al. Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, n. 6, p. 849-54, Sep 15 2002.

CICHON, M. A.; NELSON, C. M.; RADISKY, D. C. Regulation of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells by cell contact and adhesion. **Cancer Inform**, v. 14, n. Suppl 3, p. 1-13, 2015.

COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p. 1073-81, Jul 2009.

COUTINHO-CAMILLO, C. M. et al. Expression of apoptosis-regulating miRNAs and target mRNAs in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Genet**, v. 208, n. 7-8, p. 382-9, Jul-Aug 2015.

CROUCHER, D. R. et al. Cortactin modulates RhoA activation and expression of Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors to promote cell cycle progression in 11q13-amplified head and neck squamous cell carcinoma cells. **Mol Cell Biol**, v. 30, n. 21, p. 5057-70, Nov 2010.

CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer. **Semin Cell Dev Biol**, v. 39, p. 26-34, Mar 2015.

DE CARVALHO-NETO, P. B. et al. FAS/FASL expression profile as a prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69024, 2013.

DIEPENBRUCK, M.; CHRISTOFORI, G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? **Curr Opin Cell Biol**, v. 43, p. 7-13, Dec 2016.

DOBLE, B. W.; WOODGETT, J. R. Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial-mesenchymal transitions. **Cells Tissues Organs**, v. 185, n. 1-3, p. 73-84, 2007.

DONG, W. et al. Clinical significance of microRNA-24 expression in esophageal squamous cell carcinoma. **Neoplasia**, v. 62, n. 2, p. 250-8, 2015.

EULALIO, A.; HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 9-14, Jan 11 2008.

EULALIO, A. et al. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. **RNA**, v. 15, n. 1, p. 21-32, Jan 2009.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 2, p. 102-14, Feb 2008.

FRANCESCONI, R.; HOU, V.; GRIVENNIKOV, S. I. Microbiome, inflammation, and cancer. **Cancer J**, v. 20, n. 3, p. 181-9, May-Jun 2014.

GAO, J.; ZHAO, S.; HALSTENSEN, T. S. Increased interleukin-6 expression is associated with poor prognosis and acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v. 35, n. 6, p. 3265-74, Jun 2016.

GEORGY, S. R. et al. Identification of a Novel Proto-oncogenic Network in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 107, n. 9, Sep 2015.

GHAHHARI, N. M.; BABASHAH, S. Interplay between microRNAs and WNT/beta-catenin signalling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in cancer. **Eur J Cancer**, v. 51, n. 12, p. 1638-49, Aug 2015.

GRAVES, C. A. et al. The translational significance of epithelial-mesenchymal transition in head and neck cancer. **Clin Transl Med**, v. 3, n. 1, p. 60, Dec 2014.

GUO, L. et al. Genetic variations in the PI3K/AKT pathway predict platinum-based neoadjuvant chemotherapeutic sensitivity in squamous cervical cancer. **Life Sci**, v. 143, p. 217-24, Dec 15 2015.

GUO, Y. et al. miR-24 functions as a tumor suppressor in Hep2 laryngeal carcinoma cells partly through down-regulation of the S100A8 protein. **Oncol Rep**, v. 27, n. 4, p. 1097-103, Apr 2012.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 8, p. 509-24, Aug 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

HARADA, K. et al. The role of microRNA in esophageal squamous cell carcinoma. **J Gastroenterol**, v. 51, n. 6, p. 520-30, Jun 2016.

HASHIBE, M. et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **J Natl Cancer Inst**, v. 99, n. 10, p. 777-89, May 16 2007.

HAUSSER, J.; ZAVOLAN, M. Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression. **Nat Rev Genet**, v. 15, n. 9, p. 599-612, Sep 2014.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. **Mol Cancer**, v. 12, p. 86, Aug 02 2013.

HOLZ, C. et al. Epithelial-mesenchymal-transition induced by EGFR activation interferes with cell migration and response to irradiation and cetuximab in head and neck cancer cells. **Radiother Oncol**, v. 101, n. 1, p. 158-64, Oct 2011.

HOU, X. et al. Ubiquitin-specific protease 4 promotes TNF-alpha-induced apoptosis by deubiquitination of RIP1 in head and neck squamous cell carcinoma. **FEBS Lett**, v. 587, n. 4, p. 311-6, Feb 14 2013.

HUANG, J. et al. MicroRNAs as oncogenes or tumour suppressors in oesophageal cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. **Cell Prolif**, v. 47, n. 4, p. 277-86, Aug 2014.

HUI, Y. et al. miRNA-101 acts as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma by targeting CX chemokine receptor 7. **Am J Transl Res**, v. 8, n. 11, p. 4902-4911, 2016.

ISAACSSON VELHO, P. H.; CASTRO, G., JR.; CHUNG, C. H. Targeting the PI3K Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, p. 123-8, 2015.

IWAI, K. Diverse ubiquitin signaling in NF-kappaB activation. **Trends Cell Biol**, v. 22, n. 7, p. 355-64, Jul 2012.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, Mar-Apr 2011.

JL, W.; SUN, B.; SU, C. Targeting MicroRNAs in Cancer Gene Therapy. **Genes (Basel)**, v. 8, n. 1, Jan 09 2017.

JIANG, F. et al. miR-222 regulates the cell biological behavior of oral squamous cell carcinoma by targeting PUMA. **Oncol Rep**, v. 31, n. 3, p. 1255-62, Mar 2014.

JIANG, H. et al. Diverse roles of miR-29 in cancer (review). **Oncol Rep**, v. 31, n. 4, p. 1509-16, Apr 2014.

JIANG, Y.; DUAN, Y.; ZHOU, H. MicroRNA-27a directly targets to inhibit cell proliferation in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncol Lett**, v. 9, n. 1, p. 471-477, Jan 2015.

JING, C. et al. MicroRNA-17/20a impedes migration and invasion via TGF-beta/ITGB6 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. **Am J Cancer Res**, v. 6, n. 7, p. 1549-62, 2016.

KALLERGI, G. et al. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 3, p. R59, Jun 10 2011.

KINOSHITA, T. et al. Tumour-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion by targeting laminin-integrin signalling in head and neck squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v. 109, n. 10, p. 2636-45, Nov 12 2013.

KNOWLES, J. A. et al. Disruption of the AKT pathway inhibits metastasis in an orthotopic model of head and neck squamous cell carcinoma. **Laryngoscope**, v. 121, n. 11, p. 2359-65, Nov 2011.

KOMATSU, S. et al. Circulating miR-21 as an independent predictive biomarker for chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma. **Am J Cancer Res**, v. 6, n. 7, p. 1511-23, 2016.

KOSHIZUKA, K. et al. The microRNA signatures: aberrantly expressed microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. **J Hum Genet**, v. 62, n. 1, p. 3-13, Jan 2017.

KRISHNAN, R. et al. Association of Serum and Salivary Tumor Necrosis Factor- α with Histological Grading in Oral Cancer and its Role in Differentiating Premalignant and Malignant Oral Disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 17, p. 7141-7148, 2014.

- KUMARSWAMY, R. et al. MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snai1 and is downregulated in non-small cell lung cancer. **Int J Cancer**, v. 130, n. 9, p. 2044-53, May 01 2012.
- LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 3, p. 178-96, Mar 2014.
- LEE, S.; KUMAR, S. Actomyosin stress fiber mechanosensing in 2D and 3D. **F1000Res**, v. 5, 2016.
- LEE, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415-9, Sep 25 2003.
- LEGGETT, S. E. et al. Morphological single cell profiling of the epithelial-mesenchymal transition. **Integr Biol (Camb)**, v. 8, n. 11, p. 1133-1144, Nov 07 2016.
- LI, M. et al. MicroRNA-101 is a potential prognostic indicator of laryngeal squamous cell carcinoma and modulates CDK8. **J Transl Med**, v. 13, p. 271, Aug 19 2015.
- LI, P. et al. MicroRNAs in laryngeal cancer: implications for diagnosis, prognosis and therapy. **Am J Transl Res**, v. 8, n. 5, p. 1935-44, 2016.
- LI, X. et al. Wilms' tumor gene 1 regulates p63 and promotes cell proliferation in squamous cell carcinoma of the head and neck. **BMC Cancer**, v. 15, p. 342, May 01 2015.
- LIEN, E. C.; DIBBLE, C. C.; TOKER, A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. **Curr Opin Cell Biol**, v. 45, p. 62-71, Mar 23 2017.
- LIN, Y. et al. p53 modulates NF-kappaB mediated epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 51, n. 10, p. 921-8, Oct 2015.
- LINDENBERGH-VAN DER PLAS, M. et al. Identification of lethal microRNAs specific for head and neck cancer. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 20, p. 5647-57, Oct 15 2013.
- LIU, F.; MILLAR, S. E. Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease. **J Dent Res**, v. 89, n. 4, p. 318-30, Apr 2010.
- LIU, W. et al. MicroRNA-373 promotes migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting TIMP3 expression. **Am J Cancer Res**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.
- LU, W. et al. Effects of HPV-16 infection on hypopharyngeal squamous cell carcinoma and FaDu cells. **Oncol Rep**, v. 35, n. 1, p. 99-106, Jan 2016.
- MA, J. et al. Adenovirus-mediated RhoA shRNA suppresses growth of esophageal squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo. **Med Oncol**, v. 29, n. 1, p. 119-26, Mar 2012.

MANIKANDAN, M. et al. Oral squamous cell carcinoma: microRNA expression profiling and integrative analyses for elucidation of tumourigenesis mechanism. **Mol Cancer**, v. 15, p. 28, 2016.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, Jul 24 2008.

MANTOVANI, A.; GARLANDA, C.; ALLAVENA, P. Molecular pathways and targets in cancer-related inflammation. **Ann Med**, v. 42, n. 3, p. 161-70, Apr 2010.

MARIE-EGYPTIENNE, D. T.; LOHSE, I.; HILL, R. P. Cancer stem cells, the epithelial to mesenchymal transition (EMT) and radioresistance: potential role of hypoxia. **Cancer Lett**, v. 341, n. 1, p. 63-72, Nov 28 2013.

MARTELLI, A. M. et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 12, p. 2168-78, Dec 2012.

MASSAGUE, J.; OBENAUF, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298-306, Jan 21 2016.

MASUI, T. et al. Snail-induced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. **Int J Oncol**, v. 44, n. 3, p. 693-9, Mar 2014.

MCCUBREY, J. A. et al. Diverse roles of GSK-3: Tumor promoter–tumor suppressor, target in cancer therapy. **Advances in Biological Regulation**, v. 54, p. 176-196, 2014.

MCCUBREY, J. A. et al. Roles of GSK-3 and microRNAs on epithelial mesenchymal transition and cancer stem cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 14221-14250, Feb 21 2017.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 4, p. a008656, Apr 2013.

MENDELSON, A. H. et al. Snail as a novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **Am J Otolaryngol**, v. 33, n. 1, p. 6-13, Jan-Feb 2012.

MISHRA, R.; NAGINI, S.; RANA, A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. **Mol Cancer**, v. 14, p. 20, Feb 03 2015.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFkappaB system. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 8, n. 3, p. 227-41, May 2016.

MURAMATSU, T. et al. The hypusine cascade promotes cancer progression and metastasis through the regulation of RhoA in squamous cell carcinoma. **Oncogene**, v. 35, n. 40, p. 5304-5316, Oct 06 2016.

MURRAY, M. J.; NICHOLSON, J. C.; COLEMAN, N. Biology of childhood germ cell tumours, focussing on the significance of microRNAs. **Andrology**, v. 3, n. 1, p. 129-39, Jan 2015.

- MURUGAN, A. K.; MUNIRAJAN, A. K.; TSUCHIDA, N. Ras oncogenes in oral cancer: the past 20 years. **Oral Oncol**, v. 48, n. 5, p. 383-92, May 2012.
- NAKANO, Y. et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in oral squamous cell carcinoma. **Jpn J Cancer Res**, v. 90, n. 8, p. 858-66, Aug 1999.
- NAKASHIRO, K. et al. Identification of Akt1 as a potent therapeutic target for oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 47, n. 4, p. 1273-81, Oct 2015.
- OBENAUF, A. C. et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. **Nature**, v. 520, n. 7547, p. 368-72, Apr 16 2015.
- OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 4, p. a000034, Oct 2009.
- OTA, I. et al. Snail-induced EMT promotes cancer stem cell-like properties in head and neck cancer cells. **Oncol Rep**, v. 35, n. 1, p. 261-6, Jan 2016.
- PACCEZ, J. D. et al. Inactivation of GSK3beta and activation of NF-kappaB pathway via Axl represents an important mediator of tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma. **Mol Biol Cell**, v. 26, n. 5, p. 821-31, Mar 01 2015.
- PALUSZCZAK, J. et al. The negative regulators of Wnt pathway-DACH1, DKK1, and WIF1 are methylated in oral and oropharyngeal cancer and WIF1 methylation predicts shorter survival. **Tumour Biol**, v. 36, n. 4, p. 2855-61, Apr 2015.
- PELUCCHI, C. et al. Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver. **Eur J Cancer Prev**, v. 17, n. 4, p. 340-4, Aug 2008.
- PENG, F. et al. miR-23a promotes cisplatin chemoresistance and protects against cisplatin-induced apoptosis in tongue squamous cell carcinoma cells through Twist. **Oncol Rep**, v. 33, n. 2, p. 942-50, Feb 2015.
- PFISTERER, K. et al. PI3K/PTEN/AKT/mTOR polymorphisms: association with clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving cetuximab-docetaxel. **Head Neck**, v. 37, n. 4, p. 471-8, Apr 2015.
- PIRES, B. R. et al. NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169622, 2017.
- QIU, K. et al. miR-22 regulates cell invasion, migration and proliferation in vitro through inhibiting CD147 expression in tongue squamous cell carcinoma. **Arch Oral Biol**, v. 66, p. 92-7, Jun 2016.
- QUINTANA, A. et al. Overexpression of the nuclear factor-kappa B (p65) in association with local failure in patients with head and neck carcinoma undergoing radiotherapy or chemoradiotherapy. **Head Neck**, v. 35, n. 3, p. 370-5, Mar 2013.
- RAPOSO, T. P. et al. Inflammation and cancer: till death tears them apart. **Vet J**, v. 205, n. 2, p. 161-74, Aug 2015.

RATH, G. et al. Clinical significance of inactivated glycogen synthase kinase 3beta in HPV-associated cervical cancer: Relationship with Wnt/beta-catenin pathway activation. **Am J Reprod Immunol**, v. 73, n. 5, p. 460-78, May 2015.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 16, n. 3, p. 203-222, Mar 2017.

SAIGUSA, S. et al. Clinical implications of Fas/Fas ligand expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma following neoadjuvant chemoradiotherapy. **Mol Clin Oncol**, v. 3, n. 1, p. 151-156, Jan 2015.

SCANLON, C. S. et al. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. **J Dent Res**, v. 92, n. 2, p. 114-21, Feb 2013.

SCHINDLER, A. et al. Dysphagia in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and systemic therapies: Literature review and consensus. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 96, n. 2, p. 372-84, Nov 2015.

SCHLECHT, N. F. et al. Effect of smoking cessation and tobacco type on the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. **Epidemiology**, v. 10, n. 4, p. 412-8, Jul 1999.

SEINO, S. et al. CD44(high) /ALDH1(high) head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3beta-dependent cancer stem cell properties. **J Oral Pathol Med**, v. 45, n. 3, p. 180-8, Mar 2016.

SEOK, H. et al. MicroRNA Target Recognition: Insights from Transcriptome-Wide Non-Canonical Interactions. **Mol Cells**, v. 39, n. 5, p. 375-81, May 31 2016.

SERVA, A.; CLAAS, C.; STARKUVIENE, V. A Potential of microRNAs for High-Content Screening. **J Nucleic Acids**, v. 2011, p. 870903, 2011.

SEYHAN, A. A. et al. A genome-wide RNAi screen identifies novel targets of neratinib resistance leading to identification of potential drug resistant genetic markers. **Mol Biosyst**, v. 8, n. 5, p. 1553-70, Apr 2012.

SHIAH, S. G. et al. Downregulated miR329 and miR410 promote the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting Wnt-7b. **Cancer Res**, v. 74, n. 24, p. 7560-72, Dec 15 2014.

SHIAH, S. G.; SHIEH, Y. S.; CHANG, J. Y. The Role of Wnt Signaling in Squamous Cell Carcinoma. **J Dent Res**, v. 95, n. 2, p. 129-34, Feb 2016.

SHIN, D. M.; KHURI, F. R. Advances in the management of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head Neck**, v. 35, n. 3, p. 443-53, Mar 2013.

SIMPSON, D. R.; MELL, L. K.; COHEN, E. E. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol**, v. 51, n. 4, p. 291-8, Apr 2015.

SINGH, S.; CARPENTER, A. E.; GENOVESIO, A. Increasing the Content of High-Content Screening: An Overview. **J Biomol Screen**, v. 19, n. 5, p. 640-50, Jun 2014.

SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 86, n. 5, p. 1065-73, Nov 2009.

STROBELT, H. et al. HITSEE KNIME: a visualization tool for hit selection and analysis in high-throughput screening experiments for the KNIME platform. **BMC Bioinformatics**, v. 13 Suppl 8, p. S4, 2012.

STURGIS, E. M.; CINCIRIPINI, P. M. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? **Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1429-35, Oct 1 2007.

SUN, Q. et al. Dysregulated miR-363 affects head and neck cancer invasion and metastasis by targeting podoplanin. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 3, p. 513-20, Mar 2013.

SWIECICKI, P. L.; MALLOY, K. M.; WORDEN, F. P. Advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma: Pathogenesis, treatment, and novel therapeutic approaches. **World J Clin Oncol**, v. 7, n. 1, p. 15-26, Feb 10 2016.

TABRIZI, M. et al. Evaluating the miR-302b and miR-145 expression in formalin-fixed paraffin-embedded samples of esophageal squamous cell carcinoma. **Arch Iran Med**, v. 18, n. 3, p. 173-8, Mar 2015.

TIAN, F. et al. Comparison of the effect of p65 siRNA and curcumin in promoting apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells and in nude mice. **Oncol Rep**, v. 28, n. 1, p. 232-40, Jul 2012.

TIAN, Y. et al. MicroRNA-27a promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting PLK2 in laryngeal carcinoma. **BMC Cancer**, v. 14, p. 678, 2014.

TITZE-DE-ALMEIDA, R.; DAVID, C.; TITZE-DE-ALMEIDA, S. S. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. **Pharm Res**, Apr 07 2017.

TOKER, A.; MARMIROLI, S. Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. **Adv Biol Regul**, v. 55, p. 28-38, May 2014.

TONG, L.; YUAN, Y.; WU, S. Therapeutic microRNAs targeting the NF-kappa B signaling circuits of cancers. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 81, p. 1-15, Jan 2015.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 2, p. 87-108, Mar 2015.

TU, H. F. et al. Upregulation of miR-372 and -373 associates with lymph node metastasis and poor prognosis of oral carcinomas. **Laryngoscope**, v. 125, n. 11, p. E365-70, Nov 2015.

VANDER BROEK, R. et al. Chemoprevention of head and neck squamous cell carcinoma through inhibition of NF-kappaB signaling. **Oral Oncol**, v. 50, n. 10, p. 930-41, Oct 2014.

VON KARSTEDT, S.; MONTINARO, A.; WALCZAK, H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 6, p. 352-366, May 24 2017.

VRANA, D. et al. Potential Predictive Role of MicroRNAs in the Neoadjuvant Treatment of Esophageal Cancer. **Anticancer Res**, v. 37, n. 2, p. 403-412, Feb 2017.

WANG, F. et al. NF-kappaBP65 promotes invasion and metastasis of oesophageal squamous cell cancer by regulating matrix metalloproteinase-9 and epithelial-to-mesenchymal transition. **Cell Biol Int**, v. 37, n. 8, p. 780-8, Aug 2013.

WANG, H. et al. Stabilization of Snail through AKT/GSK-3beta signaling pathway is required for TNF-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer PC3 cells. **Eur J Pharmacol**, v. 714, n. 1-3, p. 48-55, Aug 15 2013.

WANG, H. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF-alpha requires AKT/GSK-3beta-mediated stabilization of snail in colorectal cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56664, 2013.

WANG, L. L. et al. MiR-30a increases cisplatin sensitivity of gastric cancer cells through suppressing epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 9, p. 1733-9, May 2016.

WANG, Y. et al. Suppression of the Growth and Invasion of Human Head and Neck Squamous Cell Carcinomas via Regulating STAT3 Signaling and the miR-21/beta-catenin Axis with HJC0152. **Mol Cancer Ther**, v. 16, n. 4, p. 578-590, Apr 2017.

WANG, Y. et al. The role of miRNA-29 family in cancer. **Eur J Cell Biol**, v. 92, n. 3, p. 123-8, Mar 2013.

WANG, Y. et al. Targeting miR-21 with AS-miR-21 suppresses aggressive growth of human tongue squamous cell carcinoma in vivo. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 5, p. 4773-81, 2015.

WENG, J. et al. miR-373-3p Targets DKK1 to Promote EMT-Induced Metastasis via the Wnt/beta-Catenin Pathway in Tongue Squamous Cell Carcinoma. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 6010926, 2017.

WHEELOCK, M. J. et al. Cadherin switching. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 6, p. 727-35, Mar 15 2008.

WIKNER, J. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and circulating tumour cells. **World J Clin Oncol**, v. 5, n. 2, p. 114-124, May 10 2014.

WU, B. et al. MiRNA-101 inhibits oral squamous-cell carcinoma growth and metastasis by targeting zinc finger E-box binding homeobox 1. **Am J Cancer Res**, v. 6, n. 6, p. 1396-407, 2016.

WU, X. Z. et al. MiR-27a-3p promotes esophageal cancer cell proliferation via F-box and WD repeat domain-containing 7 (FBXW7) suppression. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 9, p. 15556-62, 2015.

WU, Y. et al. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. **Cancer Cell**, v. 15, n. 5, p. 416-28, May 5 2009.

WU, Y.; ZHOU, B. P. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. **Br J Cancer**, v. 102, n. 4, p. 639-44, Feb 16 2010.

XIA, X.; WONG, S. T. Concise review: a high-content screening approach to stem cell research and drug discovery. **Stem Cells**, v. 30, n. 9, p. 1800-7, Sep 2012.

XIE, M.; STEITZ, J. A. Versatile microRNA biogenesis in animals and their viruses. **RNA Biology**, v. 11, n. 6, p. 673-681, 2014.

XU, L. et al. MicroRNA-24 inhibits growth, induces apoptosis, and reverses radioresistance in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein. **Cancer Cell Int**, v. 15, p. 61, 2015.

XU, X. L. et al. MicroRNA-17, microRNA-18a, and microRNA-19a are prognostic indicators in esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Thorac Surg**, v. 97, n. 3, p. 1037-45, Mar 2014.

YAN, B. et al. Unraveling regulatory programs for NF-kappaB, p53 and microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73656, 2013.

YAN, G. et al. Silencing RhoA inhibits migration and invasion through Wnt/beta-catenin pathway and growth through cell cycle regulation in human tongue cancer. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 46, n. 8, p. 682-90, Aug 2014.

YANG, C. et al. miR-22 is down-regulated in esophageal squamous cell carcinoma and inhibits cell migration and invasion. **Cancer Cell Int**, v. 14, n. 1, p. 138, 2014.

YANG, C. J. et al. miR-221 and miR-222 expression increased the growth and tumorigenesis of oral carcinoma cells. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 7, p. 560-6, Aug 2011.

YANG, C. N. et al. MicroRNA-29b regulates migration in oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. **Oral Oncol**, v. 51, n. 2, p. 170-7, Feb 2015.

YE, X.; WEINBERG, R. A. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. **Trends Cell Biol**, v. 25, n. 11, p. 675-86, Nov 2015.

YU, M. et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 580-4, Feb 01 2013.

YU, X. et al. Loss of connective tissue growth factor as an unfavorable prognosis factor activates miR-18b by PI3K/AKT/C-Jun and C-Myc and promotes cell growth in nasopharyngeal carcinoma. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e634, 2013.

ZEGERS, M. M.; FRIEDL, P. Rho GTPases in collective cell migration. **Small GTPases**, v. 5, p. e28997, 2014.

ZHANG, J. et al. Slug is a key mediator of hypoxia induced cadherin switch in HNSCC: correlations with poor prognosis. **Oral Oncol**, v. 49, n. 11, p. 1043-50, Nov 2013.

ZHANG, X. W. et al. High microRNA-23a expression in laryngeal squamous cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. **Diagn Pathol**, v. 10, p. 22, 2015.

ZHAO, J. et al. miR-24 promotes the proliferation, migration and invasion in human tongue squamous cell carcinoma by targeting FBXW7. **Oncol Rep**, v. 36, n. 2, p. 1143-9, Aug 2016.

ZHENG, H.; KANG, Y. Multilayer control of the EMT master regulators. **Oncogene**, v. 33, n. 14, p. 1755-63, Apr 03 2014.

ZHU, L. et al. microRNA-27a functions as a tumor suppressor in esophageal squamous cell carcinoma by targeting KRAS. **Oncol Rep**, v. 31, n. 1, p. 280-6, Jan 2014.

ANEXO A - Certificado de dispensa de apreciação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Solicitação de dispensa de apreciação pelo CEP/HCFMRP

Prezada Dra. Márcia Villanova,

Venho, por meio desta, solicitar a dispensa da apreciação do meu projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP – CEP/HCFMRP. Este projeto, intitulado "Análise Funcional em Larga-Escala para a Identificação de microRNAs com Potencial Antitumoral e Antimetastático no Câncer de Cabeça e Pescoço", se baseia na utilização de células derivadas de uma linhagem comercial de câncer de orofaringe: FADU, que somente apresenta efeito tumorigênico em modelos murinos com sistema imune inibido (*nude mice*). Em resumo, durante a execução desse projeto, tais células serão sujeitas ao silenciamento temporário da expressão gênica através da ação de microRNAs, moléculas que induzem a degradação ou a repressão transcricional de RNA mensageiros, logo, não induzem a alterações gênicas e não levam a geração de organismos geneticamente modificados. Finalmente, a avaliação do papel das moléculas de microRNAs em alterar o fenótipo das células cancerosas será feita inteiramente através de procedimentos realizados *in vitro*, por meio de ensaios de expressão gênica ou ensaios baseados em imunofluorescência. Recentemente um resumo desse projeto foi aprovado para apresentação, em formato de pôster, no IX Congresso Franco-Brasileiro de Oncologia (10/11/2016 a 12/11/2016, Rio de Janeiro, Brasil). A dispensa de apreciação do CEP/HCFMRP irá possibilitar a solicitação de auxílio financeiro à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA), sendo esse indispensável para a apresentação do trabalho aprovado no congresso.

Atenciosamente,

Não há necessidade de submissão ao
Comitê de Ética em Pesquisa:

Dra. Márcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
do HC e FMRP-USP

24/10/2016

Bruno Braga Sangiorgi
Doutorando, departamento de genética da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP).
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto
(FUNDHERP), Rua Tenente Catão Roxo, 2501, Tel.
(16) 2101-9300

Ribeirão Preto
18/10/2016

ANEXO B - Vias moleculares significativamente enriquecidas com alvos preditos de grupos de microRNAs específicos

Vias moleculares significativamente enriquecidas com alvos do grupo C1a:

10 chart records [Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	KEGG_PATHWAY	Focal adhesion	RT		14	0,2	1,2E-2	8,2E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	RT		8	0,1	1,9E-2	7,3E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Glycerophospholipid metabolism	RT		7	0,1	2,2E-2	6,3E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Axon guidance	RT		10	0,2	2,3E-2	5,5E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Dilated cardiomyopathy	RT		8	0,1	2,8E-2	5,4E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	RT		7	0,1	3,5E-2	5,6E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Heparan sulfate biosynthesis	RT		4	0,1	5,0E-2	6,3E-1
☐	BBID	83.Growth factors Survival factors Mitogens	RT		3	0,0	6,1E-2	9,0E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Vascular smooth muscle contraction	RT		8	0,1	6,9E-2	7,1E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Cytokine-cytokine receptor interaction	RT		14	0,2	7,9E-2	7,1E-1

Vias moleculares significativamente enriquecidas com alvos do grupo C1b:

15 chart records [Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	KEGG_PATHWAY	Type II diabetes mellitus	RT		6	0,2	1,3E-3	1,4E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Pancreatic cancer	RT		6	0,2	8,6E-3	3,8E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Chronic myeloid leukemia	RT		6	0,2	1,0E-2	3,1E-1
☐	KEGG_PATHWAY	MAPK signaling pathway	RT		11	0,3	1,9E-2	4,1E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Insulin signaling pathway	RT		7	0,2	3,2E-2	5,1E-1
☐	KEGG_PATHWAY	T cell receptor signaling pathway	RT		6	0,2	4,2E-2	5,4E-1
☐	KEGG_PATHWAY	VEGF signaling pathway	RT		5	0,2	4,3E-2	5,0E-1
☐	KEGG_PATHWAY	B cell receptor signaling pathway	RT		5	0,2	4,3E-2	5,0E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Oocyte meiosis	RT		6	0,2	4,5E-2	4,7E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Small cell lung cancer	RT		5	0,2	6,1E-2	5,4E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Pathways in cancer	RT		11	0,3	6,3E-2	5,1E-1
☐	KEGG_PATHWAY	mTOR signaling pathway	RT		4	0,1	6,4E-2	4,8E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Non-small cell lung cancer	RT		4	0,1	7,0E-2	4,8E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Prostate cancer	RT		5	0,2	7,2E-2	4,7E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Heparan sulfate biosynthesis	RT		3	0,1	7,7E-2	4,7E-1

Vias moleculares significativamente enriquecidas com alvos do grupo C2:

21 chart records [Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	KEGG_PATHWAY	Small cell lung cancer	RT		19	0,1	1,1E-3	1,8E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Pathways in cancer	RT		50	0,3	1,7E-3	1,4E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Apoptosis	RT		17	0,1	1,0E-2	4,5E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Phosphatidylinositol signaling system	RT		15	0,1	1,2E-2	4,2E-1
☐	KEGG_PATHWAY	B cell receptor signaling pathway	RT		15	0,1	1,4E-2	3,9E-1
☐	BBID	30.kinesin superfamily proteins	RT		4	0,0	1,6E-2	6,4E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Prostate cancer	RT		16	0,1	2,6E-2	5,5E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Adipocytokine signaling pathway	RT		13	0,1	2,9E-2	5,3E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Toll-like receptor signaling pathway	RT		17	0,1	3,8E-2	5,8E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Fc epsilon RI signaling pathway	RT		14	0,1	4,0E-2	5,6E-1
☐	BIOCARTA	Toll-Like Receptor Pathway	RT		9	0,0	4,4E-2	1,0E0
☐	BIOCARTA	IL 6 signaling pathway	RT		6	0,0	5,0E-2	1,0E0
☐	KEGG_PATHWAY	Neurotrophin signaling pathway	RT		19	0,1	6,0E-2	6,7E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Colorectal cancer	RT		14	0,1	6,7E-2	6,7E-1
☐	KEGG_PATHWAY	MAPK signaling pathway	RT		35	0,2	7,0E-2	6,6E-1
☐	KEGG_PATHWAY	SNARE interactions in vesicular transport	RT		8	0,0	7,5E-2	6,6E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Inositol phosphate metabolism	RT		10	0,1	8,0E-2	6,5E-1
☐	KEGG_PATHWAY	NOD-like receptor signaling pathway	RT		11	0,1	8,0E-2	6,3E-1
☐	BIOCARTA	Role of Mitochondria in Apoptotic Signaling	RT		6	0,0	8,7E-2	1,0E0
☐	KEGG_PATHWAY	Glioma	RT		11	0,1	8,7E-2	6,4E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Calcium signaling pathway	RT		24	0,1	9,7E-2	6,6E-1

Vias moleculares significativamente enriquecidas com alvos do grupo C3:

11 chart records [Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	BIOCARTA	Toll-Like Receptor Pathway	RT		7	0,1	1,9E-2	9,6E-1
☐	KEGG_PATHWAY	MAPK signaling pathway	RT		22	0,2	3,6E-2	1,0E0
☐	BBID	68.Mitogen signaling in growth control	RT		3	0,0	5,5E-2	9,2E-1
☐	KEGG_PATHWAY	p53 signaling pathway	RT		8	0,1	6,1E-2	9,9E-1
☐	KEGG_PATHWAY	RNA degradation	RT		7	0,1	7,3E-2	9,8E-1
☐	BIOCARTA	Bystander B Cell Activation	RT		3	0,0	7,7E-2	1,0E0
☐	KEGG_PATHWAY	Apoptosis	RT		9	0,1	8,1E-2	9,6E-1
☐	KEGG_PATHWAY	Lysosome	RT		11	0,1	8,1E-2	9,3E-1
☐	BIOCARTA	MAPKinase Signaling Pathway	RT		9	0,1	9,4E-2	1,0E0
☐	BIOCARTA	HIV Induced T Cell Apoptosis	RT		3	0,0	9,5E-2	9,9E-1
☐	BIOCARTA	Eukaryotic protein translation	RT		3	0,0	9,5E-2	9,9E-1

APÊNDICE A – Manuscrito a ser submetido para publicação**TITLE:**

A high-content screening approach to identify miRs with therapeutic potential on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.

AUTHORS:

Bruno Braga Sangiorgi^{1,2}, Ildercílio Mota de Souza Lima^{1,2}, Josiane Lilian dos Santos Schiavinato², Wilson Araújo da Silva Junior^{1,2}, Rodrigo Alexandre Panepucci^{1,2}.

1 – Genetics department, Ribeirão Preto Medical School, São Paulo University, São Paulo, Brazil

2 – Center for Cell-based Therapy, Hemocenter of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Keywords: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; High-Content Screening; microRNAs.

Corresponding Author:

Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci. Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. Rua: Tenente Catão Roxo, 2501. CEP: 14051-140. Ribeirão Preto - São Paulo – Brazil. Telephone + 55.16.3602.2223. Fax + 55.16.2101.9309. e-mail: rapane@gmail.com

Abstract

Studies to date have observed an important role of inflammatory cytokines to induce EMT events in head and neck squamous cells carcinoma (HNSCC), which in turn promotes metastasis and the generation of cancer stem cells (CSC). Additionally, microRNAs associated with inflammation and pluripotency are often involved in tumor progression and metastasis on several types of cancer, although the mechanisms inherent to these relations are still not well elucidated. The present study aimed to identify, through a high-content screening approach, the role of mimetics of human microRNAs associated with inflammation and pluripotency on cell survival and EMT in a cell line derived from HNSCC. Overall, we identified microRNA mimetics that modulated multiparametric phenotypic parameters related to cell survival and EMT, as well as potential molecular pathways and targets involved on the observed effects. Overall, inflammation-associated miRs, or miRs that targeted components of inflammatory pathways were associated with reduction in cell survival and/or EMT, whereas pluripotency-associated microRNAs targeted components of cell-death by apoptosis and were associated with increase in cell survival. Strikingly, silencing the expression of *AKT1* or *RELA* led to similar phenotypic alterations in comparison to microRNA mimetics that mitigated cell survival and EMT. Altogether, our study indicates microRNAs and molecular pathways as possible agents/targets that might be of therapeutic value against HNSCC.

Introduction

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a gradual event characterized by drastic phenotypic changes that lead cells to acquire a typically fibroblastoid morphology, increasing both their migratory and invasive capacity (CHEN et al., 2017). Studies to date strongly indicate the role of EMT in the initiation of metastases, the leading cause of cancer death in the world (DIEPENBRUCK; CHRISTOFORI, 2016). EMT is regulated by a subset of transcription factors denominated master regulators of EMT, notably SNAIL1 and SNAIL2 (SLUG), Twist and members of the zinc finger E-box binding homeobox (ZEB) family (PUISIEUX; BRABLETZ; CARMEL, 2014). Once activated, such transcription factors are responsible for both silencing the expression of genes involved with the epithelial phenotype and activating those involved with the mesenchymal phenotype (ZHENG; KANG, 2014).

Up to now, it is extensively elucidated the role of cytokines from the inflammatory microenvironment, transforming growth factor beta (TGF- β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), in activate the masters regulators of EMT (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). Studies to date have observed an important role of TNF- α stimulation in inducing EMT through the activation of NF- κ B pathway, although the mechanisms inherent in this relationship have not yet been extensively elucidated (WU; ZHOU, 2010). Depending on the cellular context, NF- κ B activity results in the activation of AKT, which in turn inhibits GSK3- β , a protein involved in the degradation of SNAIL and beta-catenin, resulting in their accumulation and nuclear translocation (WANG; FANG; et al., 2013; WANG; WANG; et al., 2013). Additionally, EMT events are also regulated by cell-mediated mechanisms that induces, for example, the spatial rearrangement of TGF- β receptors to regions of intercellular contact under high-density conditions, rendering cells insensitive to EMT-inducing stimuli (ATTISANO; WRANA, 2013).

EMT events were related to the de-differentiation of cancer cells, generating cancer stem cells (CSC) with potential of self-renewal and differentiation, which are accounted for the intratumor heterogeneity, relapse and therapeutic failure in several types of cancer (MARIE-EGYPTIENNE; LOHSE; HILL, 2013). In different studies, the presence of EMT-related features in tumor tissues from HNSCC was related to the development of less differentiated lesions, lymph node metastases and more severe clinical conditions (MENDELSON et al., 2012; ZHANG et al., 2013). In the last decades, advances in the treatment of HNSCC have largely been limited to loco-regional treatment of the disease, in view of the growth in mortality associated with distant metastases over the past 40 years, which illustrates the need for the evaluation of therapeutic

approaches considering the inhibition of EMT and CSC features in cancer cells (ALLEN et al., 2013).

Studies conducted in the last decade have revealed that a number of microRNAs, targeted by NF- κ B, are often overexpressed in both inflamed and neoplastic tissues, such as miR-21 (TONG; YUAN; WU, 2015). Interestingly, in a study conducted by Yan *et al.*, based on integrated analyzes involving gene expression data, transcription factor binding sites and microRNAs, a regulatory network comprised of miR-21, miR-34 and various genes involved with inflammation, apoptosis, proliferation, adhesion, among others, in metastatic tissues derived from oral cancer and hypopharynx (YAN et al., 2013). In addition, microRNAs from miR302/367 cluster, overexpressed in embryonic stem cells and pluripotent-induced cells (PIs), are also associated with malignancy in germ cell tumors (MURRAY; NICHOLSON; COLEMAN, 2015). In the context of head and neck cancer, the overexpression of elements of cluster 302/367 was found in CSC-like cells characterized by high expression of CD44 and aldehyde dehydrogenase-1 (ALDH1) (BOURGUIGNON, 2016).

The present work was carried out to evaluate, through a high-content screening (HCS) approach, the capacity of microRNAs involved in the inflammatory microenvironment and pluripotency to inhibit/promote cell survival and EMT in cells derived from a HNSCC cell line subjected to inflammatory stimuli. Altogether, we demonstrated the potential of functional assays and *in silico* analysis to identify microRNAs and molecular targets with potential role as oncogenic or tumor suppressive, which might be further explored to evaluate its therapeutic potential.

Materials and methods

Cell Line

FADU cells (oropharynx) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. At the time of confluence, the cells were resuspended using a 10% trypsin solution, followed by passages to cell culture flasks or use in experimental procedures.

Reagents

Throughout this work, cells were stimulated with TNF- α (300-01A, PreproTech, USA) or mitomycin C (MMC, M4287, sigma-aldrich, USA). For immunostaining, we used the nuclear dye Hoechst 33342 (10 µg/mL; H1399, Thermo Scientific, USA) and cytoplasmic dye HCS CellMask Deep Red (5 µg/mL, H10294, Thermo Scientific, USA), primary antibodies: Anti-N-Cadherin mouse IgG2ab mAb (SC-271386, Santa Cruz Biotechnology), Rabbit anti-SNAIL/SLUG (ab180714, abcam), Goat anti-Vimentin (sc-7558, Santa Cruz Biotechnology) and Mouse-anti-Caspase-7 (sc-22179, Santa Cruz Biotechnology, USA), as well as secondary antibodies: Goat anti-Rabbit DyLight 488 (35553, Thermo Scientific), Goat anti-Rabbit DyLight 594 (35561, Thermo Scientific) DyLight 488 mouse (35503, Thermo Scientific) and Donkey anti-Goat DyLight 594 (SA5-1088, Thermo Scientific).

MicroRNA mimetics and siRNAs

Transfection assays were carried out with human microRNA mimetic molecules (50 nM, Thermo Scientific; Table 1). As a control for interferences from transfections, we used synthetic microRNA molecules without specific targets "Pre-miR miRNA Precursor Negative Control # 1" (PMC, # AM17110, Thermo Scientific). As a control for transfection efficiency, we used cytotoxic siRNAs siUBC, siGENOME human UBC siRNA (siUBC, #M-019408-01, Thermo Scientific).

Table 1 - microRNA mimetics

miR mimetic	Catalog number
hsa-miR-17-3p	PM12246
hsa-miR-18a-5p	PM12973
hsa-miR-18b-5p	PM10466
hsa-miR-19a-3p	PM10649
hsa-miR-19b-3p	PM10629
hsa-miR-20a-5p	PM10057
hsa-miR-20b-5p	PM10975
hsa-miR-21-5p	PM10206
hsa-miR-22-3p	PM10203
hsa-miR-23a-3p	PM10644
hsa-miR-24-3p	PM10737
hsa-miR-27a-3p	PM10939
hsa-miR-29a-3p	PM12499
hsa-miR-29b-3p	PM10103
hsa-miR-30a-5p	PM11062
hsa-miR-92a-3p	PM10916
hsa-miR-101-3p	PM11414
hsa-miR-106a-5p	PM12567
hsa-miR-145-5p	PM11480
hsa-miR-181d-5p	PM12522
hsa-miR-222-3p	PM11376
hsa-miR-302a-3p	PM10936
hsa-miR-302a-5p	PM12557
hsa-miR-302b-3p	PM10081
hsa-miR-302b-5p	PM12916
hsa-miR-302c-3p	PM10571
hsa-miR-302d-3p	PM10927
hsa-miR-363-3p	PM10149
hsa-miR-371a-3p	PM12262
hsa-miR-372-3p	PM10165
hsa-miR-373-3p	PM11024

Transfection assays were performed with the following synthetic siRNA molecules (10 nM; table 2):

Table 2 - siRNA molecules

SiRNA	Catalog number
Silencer Select Negative Control No1 (siCTR)	4390843
siGENOME human UBC siRNA (siUBC)	#M-019408-01
BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo (siFICT)	2013
Silencer Select AKT1	S660
Silencer Select CTNNB1	S438
Silencer Select GSK3B	S6241
Silencer Select RELA	S11914
Silencer Select SNAI1	S13186

Reverse transfection

To perform reverse transfection assays, RNAi molecules and lipofectamine LTX transfection reagent (15338100, Thermo Scientific) were diluted in Opti-MEM medium (31985070, Thermo Scientific), according to manufacturer's instructions. Afterwards, the solution containing the transfection reagent was added to the diluted RNAi molecules, according to manufacturer's instructions. After this period, a cell suspension in DMEM supplemented with 10% FBS was added to the liposomes.

HCS-based functional assays

Cells derived from the FADU lineage were cultured in 96-well cell culture plates specific for immunofluorescence assays (CLS3603, Corning, USA), at densities of 3000 and 4000 cells/well, under experimental conditions of absence and presence of transfection reagents, respectively. In any case, the functional tests conducted during the accomplishment of this work were realized in experimental triplicates. When necessary, after 24h of culturing, the cells were stimulated with TNF- α at the desired concentrations and incubation periods, followed by immunostaining and image acquisition/analysis.

Immunostaining

Cells were fixed and permeabilized with an 2% formaldehyde solution in methanol, for 20 minutes at -20 °C. Formaldehyde was quenched by incubation for 15 minutes with an 0.1 M glycine solution and cells were blocked by 1% FBS solution for 30 minutes. Subsequently, the cells were incubated for one hour at room temperature with primary antibodies, followed by incubation for 45 minutes with a solution containing secondary antibodies, as well as nuclear and cytoplasmic dyes.

Image acquisition/analysis

Image acquisition was performed on cells immunostained in 96 well culture plates, with aid of the High-Content Screening (HCS) device "ImageXpress® Micro XLS (Molecular Devices, USA)", used for the acquisition of nine images/well, using a 10X magnification

objective, in combination with excitation/emission filters DAPI, FITC, Cy3, Texas Red and Cy5, according to the fluorophores/dyes present in each assay.

Image analysis was performed using MetaXpress software (Molecular Devices, USA) or CellProfiler (version 2.2.0, Broad Institute, USA). Overall, images from functional assays that aimed to evaluate only the presence/absence of fluorescent dyes or markers were analyzed using MetaXpress software, whereas CellProfiler were used to analyze images from functional assays aiming the evaluation of morphometric parameters, and/or the presence and subcellular localization of fluorescent markers. In general, the results of these analyzes were processed by KNIME software (version 3.2.0), to find the average value of each parameter, per well.

Migration assay

Cells were cultured at density of 25000 cells/well in culture plates specific to migration assays Oris Pro Cell Migration Assay, 96 wells (PROCMA5, Platypus Technologies, USA) for 24h. Afterwards, cells were stimulated with 0.2 $\mu\text{g/mL}$ of mitomycin C for 2 hours, followed by incubation with TNF- α , at different concentrations, in culture media DMEM supplemented with 10% SBF, 50 U/mL penicillin and 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin for 72h. Finally, one image/well was acquired using a 4X magnification objective in combination with a transmitted light filter. With the aid of CellProfiler, a pipeline was developed to quantify the area occupied by cells at the beginning and the endpoint, which were used to quantify the cell migration as the percentage of increase in the area occupied by cells.

Clusterization of microRNA mimetics and identification of predicted targets

Based on the results of multiparametric analyzes performed with aid of CellProfiler on images from cells transfected with mimetic molecules of human microRNAs, KNIME software was used to find the median value of each parameter per well. With aid of cluster 3 software (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/>), we performed an unsupervised hierarchical clustering of microRNAs mimetics, which was visualized with aid of the Java TreeView software (<http://jtreeview.sourceforge.net/>), following by the identification of different microRNA groups based on selected criteria. With the help of KNIME software and the TargetScan database (version 7.1), that contains all the conserved human microRNAs binding sites, we developed a pipeline capable of identifying the predicted gene transcripts for most of the microRNAs in each group, comprising by the total number of microRNAs in each group

minus 2. Using the Venny platform (version 2.1), Venn diagrams were made from predicted targets of miR groups with opposite multiparametric alterations, resulting in the identification of group-exclusive predicted targets. Finally, with aid of the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, version 6.7), we identified molecular pathways significantly enriched with each group-exclusive predicted targets.

Quantitative PCR (qPCR)

Cells derived were cultured in 12-well cell culture plates, in experimental triplicates, at densities of 3.5×10^4 and 4.6×10^4 cells/well when in the absence and presence of transfection reagent, respectively. After 24h incubation, when necessary, the cells were stimulated with TNF- α for an incubation period of 48h. At the end of this period, RNA extraction was performed using TRIZOL reagent (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and total RNA was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Gene expression qPCR reactions were carried in duplicates using primers for *CDH1*: forward 5'-AGGAATTCTTGCTTTGCTAATTCTG and reverse 3'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGC; *CDH2*: forward 5'-CCCACACCCTGGAGACATTG and reverse 3'-GCCGCTTTAAGGCCCTCA; *CTNNB1*: forward 5'-TGGTTAAGCTCTTACACCCAC and reverse 3'-CACGAACAAGCAACTGAACTAG; *GSK3B*: forward 5'-GGTCTATCTTAATCTGGTGCTGG and reverse 3'-TGGATATAGGCTAACTTCGGAAC; *IL6*: forward 5'-ATGCAATAACCACCCCTGAC and reverse 3'-GAGGTGCCCATGCTACATTT; *NFKB1*: forward 5'-GAACCACACCCCTGCATATAG, and reverse 3'-GCATTTTCCCAAGAGTCATCC; *RELA*: forward 5'-TGACAAGGTGCAGAAAGAGG and reverse 3'-CACATCAGCTTGCGAAAAGG; *SNAIL1*: forward 5'-GGAAGCCTAACTACAGCGAG and reverse 3'-CAGAGTCCCAGATGAGCATTG, with aid of a CFX96 Real-Time PCR system (Bio-Rad) using Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). The results (CT) of qPCR assays were normalized by subtracting the CT value obtained from that observed in the endogenous GAPDH control of the same sample (obtaining the value of ΔC_t), to calculate the relative expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) of the genes in cells from the control group. Values of $2^{-\Delta\Delta C_t}$ were used for evaluating the gene expression levels.

Statistics

All statistical analysis were performed with aid of GraphPad Prism software version 5.0. Overall, comparisons between multiple experimental conditions were performed using the univariate "ONE-WAY Anova" test. In any case, the statistical significance was considered at $p < 0.05$.

Results

Stimulation with tumor necrosis factor alpha lead to EMT-related morphometric alterations

Functional HCS-based assays were performed to evaluate changes on morphometric parameters due to TNF- α stimulation. Overall, we observed that 48h of treatment with TNF- α led to a small reduction in the percentage of intercellular contact, as well as an increase in the cell area (data not shown). However, 72h of TNF- α dramatically changed all the morphometric parameter evaluated, including a reduction and increase in cell number and fibroblast cell shape (eccentricity), respectively. Noteworthy, the magnitude of morphometric alterations increased along with TNF- α concentration (Figure 1).

Figure 1 - Quantitative evaluation of morphological changes induced by TNF- α . Cells derived from the FADU line were stimulated or not (Control) with TNF- α (5 to 50 ng/mL), for 48h or 72h, followed by immunostaining with nuclear (Hoechst) and cytoplasmic dye (CellMask Deep Red). With the aid of the HCS system, images were acquired using a 10X objective and cubes with excitation/emission filter DAPI (Hoechst) and Cy5 (CellMask). With the aid of CellProfiler software, several morphometric parameters were evaluated. **A.** Alterations in morphometric parameters, relative to the control condition, due to TNF- α stimulation for 72h. **B.** Fluorescence photomicrographs representative of different experimental conditions. * = Statistically significant difference, in comparison to the control condition, at $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Stimulation with tumor necrosis factor alpha lead to expression of EMT-related proteins

Functional HCS-based assays were performed to evaluate changes in the expression of cytoplasmic N-Cadherin, cytoplasmic Vimentin, as well as nuclear SNAIL/SLUG, after 72h of treatment with TNF- α . Overall, we observed a tendency to increase the protein expression along with the increase in TNF- α concentration. Stimulation with TNF- α at 50 ng/mL significantly increased the expression of all the proteins evaluated, whereas stimulation with 20 ng/mL significantly increased the protein expression of vimentin and SNAIL/SLUG (Figure 2).

Figure 2. Evaluation of EMT-related protein expression levels due to TNF- α stimulation. Cells derived from the FADU line, either stimulated or not (Control) with TNF- α for 48h or 72h, were subjected to immunostaining with nuclear (Hoechst) dye, along with antibodies to N-cadherin, Vimentin and SNAIL/SLUG (SN/SL). With the aid of the HCS system, images were acquired using a 10X objective and excitation/emission filters DAPI (Hoechst), FITC (N-Cadherin, SN/SL) and Texas Red (T.Red; Vimentin). With aid of the MetaXpress software, the positivity for each marker was measured. **A.** Alterations in protein expression, relative to the control condition, due to TNF- α stimulation for 72h. **B.** Fluorescence photomicrographs, representative of the presence and location of EMT-related proteins on different experimental conditions. * = Statistically significant difference, in comparison to the control condition, at $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Tumor necrosis factor alpha induces cell migration

Cell-migration assays were performed to evaluate the capacity of TNF- α to induce the migration of cells treated with the antimetabolic agent mitomycin-C. As results, we observed that both concentrations of TNF- α significantly induced cell migration. Additionally, stimulation with TNF- α at 20 ng/mL led to a more marked increase in cell migration when compared to 50 ng/mL (Figure 3).

Figure 3 – Evaluation of alterations in cell migration due to stimulation with TNF- α . Cells derived from the FADU cell line were cultured for 24h in cell culture plates designed for migration assays, followed by treatment with MMC for 2h and stimulation or not (Control) with TNF- α at 20 or 50 ng/mL. With the help of the HCS system, transmitted light images were acquired using a 4X magnification lens. With the help of the Cell Profiler software, the cell migration rate was quantified based on the percentage increase of the area occupied by cells. **A.** Percentage of cell migration after 72h of incubation with culture medium (control) or TNF- α at 20 or 50 ng/mL. **B.** Transmitted light photomicrographs, representative of different experimental conditions at initial time (T0) and after 72h (T72). * = statistically significant difference in comparison to the control condition, at $p < 0.05$.

Tumor necrosis factor alpha lead to alterations in the expression of EMT-related genes

Gene expression assays were performed to evaluate alterations on the expression of EMT-related genes in TNF- α -stimulated cells. As results, we observed that cells derived from the FADU lineage constitutively expressed all the genes evaluated. In addition, treatment with TNF- α induced a small reduction in *CDH1* (E-cadherin), as well as a pronounced increase in *CDH2* (N-Cadherin) expression levels. Unexpectedly, TNF- α stimulation increased the expression levels of *GSK3B*. Finally, stimulation with TNF- α significantly increased *IL6* expression levels (Figure 4).

Figure 4 – Alterations in gene expression levels due to stimulation with TNF- α . Cells derived from the FADU line were stimulated or not (Control) with TNF- α (20 ng/mL) for 48h, followed by the realization of quantitative gene expression assays. ** = Statistically significant difference, in comparison to the control condition, at $p < 0.01$.

MicroRNAs lead to multiparametric phenotypic alterations in EMT-induced cells

Functional microscopy-based assays were performed to cluster microRNAs that led to similar multiparametric phenotypic alterations in EMT-induced cells, with resulted in the identification of three miR clusters (C1, C2 and C3). Regarding the survival-related parameter “count nuclei”, as well as EMT-related parameters nuclear median intensity of SNAIL/SLUG, cytoplasm median intensity of SNAIL/SLUG and cells eccentricity, C1 was further subdivided into C1a and C1b regarding differences in the effect on cell survival. In general, we observed an inversely proportional relationship between the number of cells (count nuclei) and the EMT-related parameters. Therefore, EMT-related alterations were disregarded in groups of microRNA mimetics that led to opposite alterations in cell quantity. Based on the aforementioned criteria, we identified the following groups of human microRNA mimetics: C1a (pro-proliferative/EMT); C1b (anti-proliferative); C2 (anti-proliferative/EMT) and C3 (Pro-proliferative). Noteworthy, although microRNAs mimetics from C2 were capable of mitigate both cell quantity and EMT-related parameters, the alterations were found to be heterogeneous in the former (figure 5).

Figure 5. Identification of microRNA mimetics groups with similar multiparametric alterations in EMT-induced cells. Cells derived from the FADU lineage were transfected with human microRNAs mimetics and treated with TNF- α (20 ng/mL) for 72h, followed by immunostaining and image acquisition, with aid of the HCS system, using a 10X magnification objective and cubes with emission/excitation filters DAPI (Hoechst), FITC (SNAIL/SLUG or SN/SL) and Cy5 (CellMask). With the aid of the CellProfiler software, we evaluated several morphometric parameters, besides cell quantity and presence/location of SNAIL/SLUG. With aid of Cluster 3 software, human microRNA mimetics were subjected to an unsupervised clusterization, followed by identification of distinct groups based on parameters related to cell survival and EMT. **A.** Groups of microRNAs mimetics and the graphic representation of values distribution in a heatmap, from lowest (in blue) to highest (in yellow) among the microRNAs mimetics **B.** Representative fluorescence photomicrographs of cells transfected with PMC and mimetics of human miR-18b-5p, miR-222-3p, miR-372-3p and miR-302-3p.

Groups of microRNA mimetics with opposite effects modulates inflammation-related pathways

By the realization of Venn diagrams comparing the predicted targets between C1a/C2 and C1b/C3, we identified group-specific predicted targets that were used for the assessment of significantly enriched molecular pathways. Overall, we observed that microRNAs from the C1a group targeted genes integrating focal adhesion-related molecular pathways, such as *ARHGAP5* (Rho GTPase activating protein 5) and *GSK3B*, as well as elements involved in the MAPK pathway, such as *RAP1A* (Ras-Related Protein Rap-1a) and *MAPK8* (Ras-Related Protein Rap-1a; JNK1). Among the predicted targets of C1b, we observed the presence of elements of inflammatory and MAPK pathways, such as *IKBKG* (Inhibitor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells; IKK-gamma), activator of the NF- κ B pathway, as well as *AKT2* and *AKT3*, *MAPK9* (JNK2) and *MAPK10* (JNK3; data not shown). Additionally, C2 targeted inflammatory-associated elements, such as elements of the PI3K/AKT pathway *PIK3R3* (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3), *AKT2* and *AKT3*, NF- κ B pathway: *IKBKG* and *RELA*, as well as MAPK pathway: *MAPK9* and *MAPK10*. Finally, it was observed that C3-integrating microRNAs mimetics targeted elements responsible for inducing apoptosis (data not shown), such as *AIFM1* (Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial), *BF3* (Interacting Domain Death Agonist), FAS Receptor) and *TNFRSF10B* (Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily, Member 10, or TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 2, TRAIL; Figure 6).

Groups of microRNA mimetics with opposite effects distinctly modulates the NF- κ B activity

The silencing of the predicted targets of C1a and C2 were evaluated by quantitative gene expression assays in miR-transfected and TNF- α -stimulated cells. As results, we observed that while miR-27a-3p mimetics increased *RELA* expression levels, there was a tendency for a reduction due to mimetic transfection of miR-302a-3p and miR-372-3p. Interestingly, there was a significant reduction in *IL6* expression levels due to the action of miR-19a-5p, miR-302a-3p and miR-372-3p. Otherwise, the reduction of *GSK3B* expression levels was observed in cells transfected with hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-29b-3 β and hsa-miR-372-3p (Figure 7).

Figure 7 – The activity of human microRNAs mimetics from C1a and C2 groups in silence the expression levels of predicted targets. Cells derived from the FADU cell line were transfected with PMC or mRNA molecules from C1a (hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-19a-3p and hsa-miR-27a-3p) and C2 (hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-302a-3p and hsa-miR-372-3p), followed by TNF- α stimulation at 20 ng/mL. After 48h, we performed qPCR assays with the use of primers to evaluate the gene expression of *RELA*, *IL6* and *GSK3B*. * = Statistically significant difference, in comparison to the control condition, at $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Cell survival and EMT-related parameters are regulated by components of C1a and C2 predicted regulated pathways

Functional microscopy-based assays were performed in cells transfected with siRNAs specific to components of predicted genes and pathways targeted by microRNAs from C1a or C2 groups. As results, we observed that silencing the expression of *RELA* or *GSK3B* led to a reduction in the number of cells and neighboring cells, as well as an increase in cellular eccentricity. Otherwise, silencing of *AKT1* expression led to a tendency to reduce cell number, decrease in nuclear and cytoplasmic SNAIL/SLUG expression, increase in cell area and in eccentricity. Finally, we observed that *CTNGB1* silencing led to a reduction in the number of cells and neighboring cells, increase in cell area and eccentricity, as well as a reduction in cytoplasmic SNAIL/SLUG (Figure 8).

Figure 8 – Alterations on parameters related to cell survival and EMT due to gene silencing of C1a and C2 predicted targets. Cells derived from the FADU lineage were transfected with siRNAs specific to *RELA*, *AKT1*, *GSK3B*, *CTNNB1*, followed by treatment with $\text{TNF-}\alpha$ (20 ng/mL) for 72h and immunostaining. Image acquisition was performed with aid of the HCS system, using a 10X magnification objective and cubes with emission/excitation filters DAPI (Hoechst), FITC (SNAIL/SLUG or SN/SL) and Cy5 (CellMask). With the aid of the CellProfiler software, we evaluated several morphometric parameters, besides cell quantity and presence/location of SNAIL/SLUG. **A.** Alterations in parameters related to cell survival (count nuclei), and EMT: number of neighboring cells, cell area, cell eccentricity, median nuclear/cytoplasmic SNAIL/SLUG intensity. **B.** Fluorescence photomicrographs, representative of cells transfected with siCTR, siRELA, siAKT1, siGSK3B and siCTNNB1. * = Statistically significant difference, in comparison to the control condition, at $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

***AKT1* and *RELA* gene silencing promotes cell-death by apoptosis**

Functional microscopy-based assays were performed to evaluate the effect of gene silencing of C1a and C2 predicted targets in cell death by apoptosis on unstimulated cells. As results, we observed that the individual silencing of all components evaluated resulted in reductions in cellular amount. Moreover, in both treatment times we observed that concomitant to the reduction in cellular amount, there was an increase in the number of apoptotic cells (positive for active caspase-7). Noteworthy, apoptosis induction was more pronounced and statistically significant due to gene silencing of *RELA* and *AKT1* (Figure 9).

Figure 9 – Alterations in cell survival and apoptosis due to gene silencing of C1a and C2 predicted targets. Cells derived from the FADU cell line were transfected with siRNAs against *RELA*, *AKT1*, *GSK3B*, *CTNNB1*, plus control siRNA and cytotoxic siRNA, by 24h or 48h, followed by immunostaining and image acquisition, with aid of the HCS system, using a 10X magnification objective and cubes with emission/excitation filters DAPI (Hoechst) and FITC (active caspase-7). With the aid of the MetaXpress software, we evaluated the average cell number and percentage of positive cells for active caspase-7. **A.** Mean number of cells/field and percentage of apoptotic cells (Csp-7 +) after 24h or 48h of siRNA transfection. **B.** Immunofluorescence photomicrographs, representative of immunostaining with Hoechst and Caspase-7 among the different experimental conditions and after 24h of transfection. * = Statistically significant difference, in comparison to the control condition, at $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Discussion

Inflammatory cytokines play a crucial role in promoting the epithelial-mesenchymal transition, which in turn is associated with the development of CSC-like cells. In this context, by a high-content screening approach, we evaluated the modulatory activity on cell survival and EMT, displayed by mimetics of human microRNAs, many of them with known role in inflammation and pluripotency, in a HNSCC cell line. Altogether, through functional assays and *in silico* analyses, we sought to identify microRNAs and molecular pathways to be explored as therapeutic agents or targets to be inhibited with the use of antagonist molecules.

Initially, the ideal concentration and treatment time with TNF- α to induce EMT was established by experimental procedures evaluating EMT-related alterations on morphometric and protein/gene expression, as well as cell migration. Overall, we observed that stimulation with TNF- α , at 20 ng/mL, was capable of induce EMT-related morphometric changes, the expression of EMT-related genes and proteins, as well as induce cell migration, which was found to be correlated with an increase in the constitutively active NF- κ B pathway. In line with our results, Legget and coworkers found that EMT induction by *SNAIL1* overexpression lead to morphometrical changes after 48h, which were more pronounced after 72h (LEGGETT et al., 2016). Additionally, our results from gene and protein expression are in line with the study of Holz and coworkers, which observed that TNF- α -induced EMT led to post-transcriptional modifications in SNAIL, leading to its stability and activity, whereas not interfering in *SNAIL1* gene expression levels (HOLZ et al., 2011).

From microscopy-based functional assays and *in silico* analysis in cells transfected with microRNA mimetics, we identified four groups of molecules (C1a, C1b, C2 and C3) based on the similarity/dissimilarity of multiparametric phenotypic changes related to cell survival and EMT.

Interestingly, The C1a (pro-proliferative/EMT) group was composed of microRNA mimetics traditionally involved with inflammation and tumor initiation/progression, as elements of the miR-17-92 cluster and its paralogs, miR-21 and cluster miR-23a/24/27a. In line with our observations, in a study conducted with cells derived from nasopharyngeal carcinoma, it was found that transfection with miR-18b mimetics led to an expressive increase in proliferative capacity (YU et al., 2013). Additionally, Wang and coworkers observed that gene silencing of endogenous miR-21 was associated with an expressive reduction of tumor growth and increase of the amount of apoptotic cells in TSCC xenographic tumors (WANG et al., 2015). Up to now, functional studies performed with cells derived from esophageal carcinoma cell

lines subject to ectopic expression of miR-27a have presented controversial observations about their role in inducing/inhibiting cell proliferation (JIANG; DUAN; ZHOU, 2015; WU et al., 2015).

MicroRNA mimetics from C1b group had an anti-proliferative effect, and although an accentuation of EMT-related characteristics was also observed, those might be influenced by contact-dependent mechanisms and not by direct activity of the miR mimetics. Interestingly, this group was composed of microRNAs known by its tumor suppressive effect in HNSCC, as miR-22, miR-101, and miR-222. In line with our results, in a recent study conducted with cells derived from the FADU cell line, it was observed that miR-101 mimetics transfection led to a significant reduction in cell survival and also migratory/invasive potential (HUI et al., 2016).

Opposite to what was observed in the C1a group, microRNA mimetics from C2 group displayed an inhibitory activity in both cell survival and EMT-related parameters, although in the latter the effects were varied in terms of the reduction of cellular eccentricity and presence of nuclear and cytoplasmic SNAIL/SLUG. This observations contribute to a still not defined role of miR-29 family in HNSCC, in view of conflicting findings about their sub/overexpression in tissue samples from OSCC (COUTINHO-CAMILLO et al., 2015; MANIKANDAN et al., 2016; YANG et al., 2015). In line with our results, Kinoshita and coworkers observed that the ectopic expression of mir-29 family components in the FADU cell line resulted in a significant reduction in cell number, as well as in cell migration and invasion (KINOSHITA et al., 2013). In contrast to that was observed by previous studies about the gene expression and functional role of components of miR-372/373 cluster, we observed that mimetics of miR-372 and miR-373 mitigated parameters related to cell survival and EMT (LIU et al., 2016; TU et al., 2015; WENG et al., 2017).

Mimetics of microRNAs from cluster miR-17-92 and its paralogs, as well as most microRNAs from the cluster miR-302-367, displayed a pro-proliferative effect. In line with our results, Lu and coworkers observed that the increase in endogenous levels of mR-363, promoted by the infection with human papilloma virus-16 (HPV-16) in cells derived from the FADU line, increased the proliferative capacity (LU et al., 2016). To the best of our knowledge, our results provides novel observations about the role of miR-20b, miR-23a, miR-92a, miR-106a and miR-302-367 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. These results suggest the investigation about a possible link between the regulation of CSC transcription factors by miR-302-367 cluster and HNSCC tumor progression.

Interestingly, we found that elements of focal adhesion were significantly enriched with C1a-specific predicted targets, as a Rho GTPase A (RhoA) inhibitor and *GSK3B*. RhoA is a member of a family of Rho GTPases, proteins responsible for the transduction of intracellular

signals involved in the regulation of cell migration, polarization and cell cycle (ZEGERS; FRIEDL, 2014). Different studies observed that in both TSCC and ESCC derived lines, the silencing of *RHOA* has led to a reduction in the proliferation and migration capacity *in vitro* (MA et al., 2012; YAN et al., 2014). In line with our observations, Croucher and coworkers demonstrated the role of RhoA in promote cell proliferation in FADU cells, by inducing the entrance into the S phase (CROUCHER et al., 2010). Otherwise, the role of GSK3- β in cancer biology is still being established by the scientific community, in view of conflicting findings about its oncogenic and tumor suppressor roles in different types of cancer (MCCUBREY et al., 2014). Surprisingly, it was observed that the levels of *GSK3B* gene expression were reduced by the action of mRNAs from both the C1a and C2 groups, however, since this gene was not found among C2 predicted targets, this effect possibly occurred indirectly. In the context of head and neck cancer, different studies observed the role of the PI3K/AKT and wnt/beta-catenin pathways in suppressing GSK3- β activity, which was directly related to the development of cells with CSC characteristics, as well as increased replicative and migratory potential (GEORGY et al., 2015; PACCEZ et al., 2015; SEINO et al., 2016). Interestingly, Mishra and coworkers demonstrated that the inactive form of GSK3- β has a role of induce cell proliferation in OSCC, although the molecular mechanisms inherent to this effect have not yet been fully clarified (MISHRA; NAGINI; RANA, 2015). Such observations may be associated with our results regarding the marked reduction in cell numbers as well as induction of apoptosis due to the action of siGSK3B. Surprisingly, according to our results, transfection with siRNAs against *GSK3B* did not further increased the nuclear levels of SNAIL1/2 in TNF- α -stimulated cells. However, as *in vitro* studies observed that although the silencing of *GSK3B* was responsible for the increase in protein levels of SNAIL, this effect was not observed in cells stimulated with TNF- α (WANG; FANG; *et al.*, 2013; WANG; WANG; *et al.*, 2013). As one of the possible side effects of *GSK3B* silencing, there is a possibility that increased levels of beta-catenin may have contributed to the effects observed in C1a or even C2. According to our results, the silencing of *CTNNB1* led to a marked reduction in cell survival, which probably was related to its pro-apoptotic effect, in addition, led to conflicting alterations in EMT-related parameters. In line with our observations, studies conducted with cell lines derived from different anatomical regions of HNSCC, found that beta-catenin silencing induced cell death by apoptosis (SHIAH et al., 2014). Altogether, our study provides clues about a possible need for basal levels of GSK3- β for cell survival as well as a possible therapeutic role of reducing *CTNNB1* expression in HNSCC.

Differently from that observed in the pro-tumor group C1a, many of the predicted targets of miR mimetics from C2 or C1b groups integrated molecular pathways related to the interface between inflammation and tumor initiation/progression, as PI3K/AKT and NF- κ B pathways. Noteworthy, the different AKT isoforms, despite structural and functional similarity, present a selective role in different biological processes, which is determined in part through tissue-specific expression and different regulatory domains (TOKER; MARMIROLI, 2014). In our study, since we did silence *AKT1* expression, the effects observed were probably related to a reduction in total AKT levels (AKT1 and AKT2). Interestingly, Nakashiro and coworkers recently observed that *AKT1* gene silencing led to the reduction of tumor growth in xenographic tumors of OSCC (NAKASHIRO et al., 2015). In line with our results, Knowles and coworkers observed that treatment with an allosteric AKT inhibitor led to a reduction in cell survival and migratory/invasive capacity in the FADU cell line (KNOWLES et al., 2011). Altogether, our results elucidate the therapeutic potential of *AKT1* silencing, and possibly *AKT2*, regarding its action on reducing cell survival through induction to apoptosis, as well as the nuclear and cytoplasmic levels of SNAIL/SLUG, which may be associated with interferences in EMT and metastatic potential.

Interestingly, *RELA* was a commonly predicted target of the anti-proliferative/EMT C2 group. In part by confirming the *in-silico* analysis, we observed a reduction in *RELA* levels in cells transfected with miR-302a-3p and miR-372-3p mimetics, which also led to a marked reduction in *IL6* expression, indicating the action of these molecules in inhibiting the activity of NF- κ B. Individually, the silencing of *RELA* led to a marked reduction in cell survival, which may be attributed to its action in inducing apoptosis. However, we did not observed alterations in SNAIL/SLUG expression, but an increase in cell area/eccentricity after *RELA* silencing, which may result from the inability of *RELA* silencing alone to mitigate EMT-inducing effects derived from cell-contact mechanisms. In line with our results, Tian and coworkers also observed a constitutive activation of the NF- κ B pathway in ESCC cell lines, in which the silencing of *RELA* expression led to induction of apoptosis and reduction in tumor volume in xenographic tumors (TIAN et al., 2012). Altogether, our observations indicate that P65 plays an important role in cell survival in hypopharyngeal squamous cells carcinoma and may be further explored as a potential therapeutic target.

Finally, it was observed that elements of the pro-proliferative group C3 targeted several elements that regulate cell-death by apoptosis, such as FasL-coding gene and the death regulators (DRs) Fas and TRAIL-R2. Noteworthy, the role of DRs in tumor cells is still a field of wide investigation, considering the possibility of these receptors act as amplifiers of the

inflammation instead of inducers of apoptosis, thereby potentiating the cell survival and generation of metastasis depending on the cellular context (CULLEN; MARTIN, 2015). Interestingly, in a study conducted with OSCC cell lines, stimulation with recombinant TRAIL induced apoptosis specifically from its binding with TRAIL-2 (DR-5), which was restricted to cells that constitutively expressed *RAS*, indicating the therapeutic potential of TRAIL in certain cellular contexts (CHEN et al., 2013). Also, it was observed that a lower expression of Fas was associated with worse prognosis in squamous cells carcinoma from esophagus, pharynx and oral region (ASENSIO et al., 2007; DE CARVALHO-NETO et al., 2013). Interestingly, a recent study has noted that incubation with humanized antibodies containing the cytotoxic region of FasL was able to induce cell death in cells derived from OSCC, indicating the therapeutic potential of that ligand (CHIEN et al., 2017). Taken together, our results indicate that pluripotency-related microRNAs may exert a pro-proliferative effect on cells derived from hypopharyngeal carcinoma, from the reduction in the expression of death receptors.

Although the present work has generated a novel information, besides reinforcing/contrasting previous studies, it presents limitations that need to be properly addressed. Noteworthy, the lack of assessments of gene expression changes at different time points, due to both TNF- α stimulation and gene silencing, probably led to results that, although illustrating the changes in the time periods observed, did not reflect the complexity and dynamics of variations in the expression of genes that could serve to better explain the observed results. Also, although we did observe the role of human microRNA mimetics in modulate cell survival and EMT, we did not find a group of microRNAs that led to pronounced and homogenous inhibitions in both. Therefore, it is still necessary a more in-depth study on the role of mimetics of microRNAs and molecular pathways of the C2 group, to better clarify their roles on EMT. Finally, despite the observed correlation between EMT and the nuclear expression/localization SNAIL/SLUG, we did not perform functional assays that could elucidate the causal relationship between SNAIL/SLUG and EMT in our cell model.

Despite its limitations, the present work characterized a broad spectrum of phenotypic alterations related to cell survival and EMT, displayed by mimetics of human microRNA associated with inflammation and pluripotency, leading to the identification of microRNAs and molecular pathways that might be explored as therapeutic agents/targets in HNSCC. Importantly, we observed that microRNAs that targeted elements related to inflammatory pathways had the potential to reduce cell-survival and EMT, which might be explored as therapeutic agents in HNSCC. Otherwise, microRNAs related to pluripotency had the potential to improve cell survival possibly by promoting the unresponsiveness to apoptotic stimuli in

cancer cells, which indicates the therapeutic potential of targeting pluripotency-associated miRs on HNSCC. Finally, we observed that inhibition of PI3K/AKT and NF- κ B pathways was related to the reduction in cell survival and induction of cell death, which together with results from previous studies indicate the therapeutic potential of silencing these pathways in head and neck cancer.

Bibliography

ALLEN, C. T. et al. Emerging insights into head and neck cancer metastasis. **Head Neck**, v. 35, n. 11, p. 1669-78, Nov 2013.

ASENSIO, C. et al. Fas expression is associated with a better prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Anticancer Res**, v. 27, n. 6B, p. 4083-6, Nov-Dec 2007.

ATTISANO, L.; WRANA, J. L. Signal integration in TGF-beta, WNT, and Hippo pathways. **F1000Prime Rep**, v. 5, p. 17, 2013.

BOURGUIGNON, L. Y. Matrix Hyaluronan Promotes Specific MicroRNA Upregulation Leading to Drug Resistance and Tumor Progression. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 4, p. 517, Apr 07 2016.

CHEN, J. J. et al. TRAIL induces apoptosis in oral squamous carcinoma cells--a crosstalk with oncogenic Ras regulated cell surface expression of death receptor 5. **Oncotarget**, v. 4, n. 2, p. 206-17, Feb 2013.

CHEN, T. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): A Biological Process in the Development, Stem Cell Differentiation and Tumorigenesis. **J Cell Physiol**, Jan 12 2017.

CHIEN, M. H. et al. A Fas ligand (FasL)-fused humanized antibody against tumor-associated glycoprotein 72 selectively exhibits the cytotoxic effect against oral cancer cells with a low FasL/Fas ratio. **Mol Cancer Ther**, Mar 14 2017.

COUTINHO-CAMILLO, C. M. et al. Expression of apoptosis-regulating miRNAs and target mRNAs in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Genet**, v. 208, n. 7-8, p. 382-9, Jul-Aug 2015.

CROUCHER, D. R. et al. Cortactin modulates RhoA activation and expression of Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors to promote cell cycle progression in 11q13-amplified head and neck squamous cell carcinoma cells. **Mol Cell Biol**, v. 30, n. 21, p. 5057-70, Nov 2010.

CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer. **Semin Cell Dev Biol**, v. 39, p. 26-34, Mar 2015.

DE CARVALHO-NETO, P. B. et al. FAS/FASL expression profile as a prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69024, 2013.

DIEPENBRUCK, M.; CHRISTOFORI, G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? **Curr Opin Cell Biol**, v. 43, p. 7-13, Dec 2016.

GEORGY, S. R. et al. Identification of a Novel Proto-oncogenic Network in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 107, n. 9, Sep 2015.

HOLZ, C. et al. Epithelial-mesenchymal-transition induced by EGFR activation interferes with cell migration and response to irradiation and cetuximab in head and neck cancer cells. **Radiother Oncol**, v. 101, n. 1, p. 158-64, Oct 2011.

HUI, Y. et al. miRNA-101 acts as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma by targeting CX chemokine receptor 7. **Am J Transl Res**, v. 8, n. 11, p. 4902-4911, 2016.

JIANG, Y.; DUAN, Y.; ZHOU, H. MicroRNA-27a directly targets to inhibit cell proliferation in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncol Lett**, v. 9, n. 1, p. 471-477, Jan 2015.

KINOSHITA, T. et al. Tumour-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion by targeting laminin-integrin signalling in head and neck squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v. 109, n. 10, p. 2636-45, Nov 12 2013.

KNOWLES, J. A. et al. Disruption of the AKT pathway inhibits metastasis in an orthotopic model of head and neck squamous cell carcinoma. **Laryngoscope**, v. 121, n. 11, p. 2359-65, Nov 2011.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 3, p. 178-96, Mar 2014.

LEGGETT, S. E. et al. Morphological single cell profiling of the epithelial-mesenchymal transition. **Integr Biol (Camb)**, v. 8, n. 11, p. 1133-1144, Nov 07 2016.

LIU, W. et al. MicroRNA-373 promotes migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting TIMP3 expression. **Am J Cancer Res**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

LU, W. et al. Effects of HPV-16 infection on hypopharyngeal squamous cell carcinoma and FaDu cells. **Oncol Rep**, v. 35, n. 1, p. 99-106, Jan 2016.

MA, J. et al. Adenovirus-mediated RhoA shRNA suppresses growth of esophageal squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo. **Med Oncol**, v. 29, n. 1, p. 119-26, Mar 2012.

MANIKANDAN, M. et al. Oral squamous cell carcinoma: microRNA expression profiling and integrative analyses for elucidation of tumorigenesis mechanism. **Mol Cancer**, v. 15, p. 28, 2016.

MARIE-EGYPTIENNE, D. T.; LOHSE, I.; HILL, R. P. Cancer stem cells, the epithelial to mesenchymal transition (EMT) and radioresistance: potential role of hypoxia. **Cancer Lett**, v. 341, n. 1, p. 63-72, Nov 28 2013.

MCCUBREY, J. A. et al. Diverse roles of GSK-3: Tumor promoter–tumor suppressor, target in cancer therapy. **Advances in Biological Regulation**, v. 54, p. 176-196, 2014.

MENDELSON, A. H. et al. Snail as a novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **Am J Otolaryngol**, v. 33, n. 1, p. 6-13, Jan-Feb 2012.

MISHRA, R.; NAGINI, S.; RANA, A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. **Mol Cancer**, v. 14, p. 20, Feb 03 2015.

MURRAY, M. J.; NICHOLSON, J. C.; COLEMAN, N. Biology of childhood germ cell tumours, focussing on the significance of microRNAs. **Andrology**, v. 3, n. 1, p. 129-39, Jan 2015.

NAKASHIRO, K. et al. Identification of Akt1 as a potent therapeutic target for oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 47, n. 4, p. 1273-81, Oct 2015.

PACCEZ, J. D. et al. Inactivation of GSK3beta and activation of NF-kappaB pathway via Axl represents an important mediator of tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma. **Mol Biol Cell**, v. 26, n. 5, p. 821-31, Mar 01 2015.

PUISIEUX, A.; BRABLETZ, T.; CAMEL, J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. **Nat Cell Biol**, v. 16, n. 6, p. 488-94, Jun 2014.

SEINO, S. et al. CD44(high) /ALDH1(high) head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3beta-dependent cancer stem cell properties. **J Oral Pathol Med**, v. 45, n. 3, p. 180-8, Mar 2016.

SHIAH, S. G. et al. Downregulated miR329 and miR410 promote the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting Wnt-7b. **Cancer Res**, v. 74, n. 24, p. 7560-72, Dec 15 2014.

TIAN, F. et al. Comparison of the effect of p65 siRNA and curcumin in promoting apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells and in nude mice. **Oncol Rep**, v. 28, n. 1, p. 232-40, Jul 2012.

TOKER, A.; MARMIROLI, S. Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. **Adv Biol Regul**, v. 55, p. 28-38, May 2014.

TONG, L.; YUAN, Y.; WU, S. Therapeutic microRNAs targeting the NF-kappa B signaling circuits of cancers. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 81, p. 1-15, Jan 2015.

TU, H. F. et al. Upregulation of miR-372 and -373 associates with lymph node metastasis and poor prognosis of oral carcinomas. **Laryngoscope**, v. 125, n. 11, p. E365-70, Nov 2015.

WANG, H. et al. Stabilization of Snail through AKT/GSK-3beta signaling pathway is required for TNF-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer PC3 cells. **Eur J Pharmacol**, v. 714, n. 1-3, p. 48-55, Aug 15 2013.

WANG, H. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF-alpha requires AKT/GSK-3beta-mediated stabilization of snail in colorectal cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56664, 2013.

WANG, Y. et al. Targeting miR-21 with AS-miR-21 suppresses aggressive growth of human tongue squamous cell carcinoma in vivo. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 5, p. 4773-81, 2015.

WENG, J. et al. miR-373-3p Targets DKK1 to Promote EMT-Induced Metastasis via the Wnt/beta-Catenin Pathway in Tongue Squamous Cell Carcinoma. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 6010926, 2017.

WU, X. Z. et al. MiR-27a-3p promotes esophageal cancer cell proliferation via F-box and WD repeat domain-containing 7 (FBXW7) suppression. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 9, p. 15556-62, 2015.

WU, Y.; ZHOU, B. P. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. **Br J Cancer**, v. 102, n. 4, p. 639-44, Feb 16 2010.

YAN, B. et al. Unraveling regulatory programs for NF-kappaB, p53 and microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73656, 2013.

YAN, G. et al. Silencing RhoA inhibits migration and invasion through Wnt/beta-catenin pathway and growth through cell cycle regulation in human tongue cancer. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 46, n. 8, p. 682-90, Aug 2014.

YANG, C. N. et al. MicroRNA-29b regulates migration in oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. **Oral Oncol**, v. 51, n. 2, p. 170-7, Feb 2015.

YU, X. et al. Loss of connective tissue growth factor as an unfavorable prognosis factor activates miR-18b by PI3K/AKT/C-Jun and C-Myc and promotes cell growth in nasopharyngeal carcinoma. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e634, 2013.

ZEGERS, M. M.; FRIEDL, P. Rho GTPases in collective cell migration. **Small GTPases**, v. 5, p. e28997, 2014.

ZHANG, J. et al. Slug is a key mediator of hypoxia induced cadherin switch in HNSCC: correlations with poor prognosis. **Oral Oncol**, v. 49, n. 11, p. 1043-50, Nov 2013.

ZHENG, H.; KANG, Y. Multilayer control of the EMT master regulators. **Oncogene**, v. 33, n. 14, p. 1755-63, Apr 03 2014.