UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Ana Flávia Teixeira Rossi Freire

Avaliação de mediadores da via de sinalização do fator de necrose tumoral-α e de microRNAs em câncer gástrico e efeito do silenciamento de seus receptores

São José do Rio Preto
2019

Ana Flávia Teixeira Rossi Freire

Avaliação de mediadores da via de sinalização do fator de necrose tumoral-α e de microRNAs em câncer gástrico e efeito do silenciamento de seus receptores

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo nº 2015/23392-7
Processo nº 2015/21464-0
CNPq – Processo nº140723/2015-3

Orientadora: Profª Drª Ana Elizabete Silva

São José do Rio Preto
2019

F866a

Freire, Ana Flávia Teixeira Rossi

Avaliação de mediadores da via de sinalização do fator de necrose tumoral alfa e de microRNAs em câncer gástrico e efeito do silenciamento de seus receptores / Ana Flávia Teixeira Rossi Freire. -- São José do Rio Preto, 2019

123 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Ana Elizabete Silva

1. Genética humana. 2. Fator de necrose tumoral alfa. 3. MicroRNAs. 4. Helicobacter pylori. 5. Expressão gênica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ana Flávia Teixeira Rossi Freire

Avaliação de mediadores da via de sinalização do fator de necrose tumoral-α e de microRNAs em câncer gástrico e efeito do silenciamento de seus receptores

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo nº 2015/23392-7
Processo nº 2015/21464-0
CNPq – Processo nº140723/2015-3

Comissão Examinadora

Profª. Drª. Ana Elizabete Silva
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis
Hospital de Amor - Barretos

Profª. Drª. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira
Hospital de Amor - Barretos

Profª. Drª. Dorotéia Rossi Silva Souza
FAMERP – São José do Rio Preto

Profª. Drª. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus de Ilha Solteira

São José do Rio Preto
25 de julho de 2019

À minha mãe pelo amor incondicional, à minha irmã pelo apoio e amizade e ao meu marido pelo companheirismo, compreensão e por estar sempre ao meu lado. Tenho certeza que se não fosse o apoio de vocês eu não teria alcançado mais esta vitória.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus pela vida e pelas oportunidades que colocou no meu caminho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP pelo suporte a realização deste trabalho e, especialmente, à Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos, coordenadora do Programa, pela compreensão e apoio sempre que necessário.

À Profa. Dra. Ana Elizabete Silva pela orientação, incentivo e dedicação desde o início da minha formação acadêmica, contribuindo para meu desenvolvimento científico e aquisição de um pensamento crítico. Agradeço pela paciência e tempo disponibilizados principalmente na fase final deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado e auxílio financeiro (Processos nº 2015/23392-7 e 2015/21464-0) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos primeiros meses de bolsa (Processo nº 140723/2015-3).

À Dra. Marília de Freitas Calmom Saiki pela disponibilização do Laboratório de Estudos Genômicos para a realização de parte dos experimentos e também pela colaboração no delineamento experimental do estudo in vitro.

À Profa. Dra. Sonia Maria Oliani pela disponibilização do citômetro de fluxo e a Dra. Janesly Prates pelos ensinamentos na técnica de citometria de fluxo. Agradeço também ao Mayk, Juciele e Rafaela por possibilitarem a utilização do laboratório.

Ao Dr. Fábio Eduardo Severino pela análise de redes e disponibilidade de ajudar sempre que necessário.

Ao Dr. Marcelo Lima Ribeiro, da Universidade São Francisco, pela produção do extrato da *H. pylori.*

Á banca examinadora Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis, Profa. Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira, Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza e Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni por terem aceitado participar da minha banca e por disponibilizarem tempo e conhecimento para o enriquecimento deste trabalho.

Aos pacientes, pois sem eles a realização de parte deste trabalho não seria possível.

Às amigas do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana Fernanda e Joice por toda a ajuda na realização dos procedimentos experimentais. Sem vocês este trabalho não teria sido finalizado no prazo. Agradeço também às ex alunas do laboratório Marcela, Nathália, Ayla, Júlia e Gabriela pelos momentos de convivência e descontração e por todos os conhecimentos compartilhados. Sou muito grata a vocês por tudo!

Ao Guilherme do Laboratório de Histofisiologia da Reprodução e Desregulação Endócrina pelo compartilhamento da sala de cultura celular.

A todos os professores e alunos da pós-graduação, como também aos funcionários da Seção de Pós-Graduação que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

Às minhas queridas amigas da faculdade e da vida Ana Beatriz, Ayla e Lara pela ajuda durante toda a faculdade e pelos momentos de distração que passamos juntas. Saibam que, com certeza, vocês foram e continuarão sendo parte importante da minha vida. Obrigada por tudo!

Aos meus familiares, principalmente minhas avós Olga e Aparecida, por compreender todas as horas afastadas para a realização deste trabalho e por todo o incentivo. Agradeço em especial também a minha tia Cleusa que me acolheu na sua casa por um longo período. Obrigada!

Aos companheiros da Equipe de Perícias Criminalísticas de Votuporanga, principalmente ao chefe Dr. Zanelato, pela compreensão na fase de redação da tese.

À minha irmã, Ana Carolina, pela cumplicidade e pelos momentos compartilhados. Obrigada pela colaboração com a minha educação, pela amizade, incentivo e por ter contribuído para eu me tornar a pessoa que sou hoje. Agradeço também por ter me dado o maior presente que recebi, minha afilhada Alícia que me proporciona muitos momentos de alegria. Amo vocês!

Ao meu marido, Nacim, que me apoiou durante todos estes anos e me ajudou a encarar a vida de um jeito diferente. Obrigada pelo amor, dedicação, carinho, incentivo e pela convivência. Obrigada por não ter me deixado desistir. Você faz parte da minha vida e teve uma imensa contribuição nesta conquista. Amo você!

Agradeço em especial aos meus pais, Regina e Gilberto, pois sem vocês eu não seria a pessoa que sou hoje. Obrigada pela educação que me deram e por todos os momentos felizes que compartilhamos. Mãe, agradeço pela convivência e por todo amor. Pai, mesmo não estando mais presente hoje, me inspiro na pessoa maravilhosa que você foi e tenho certeza que estaria muito feliz e realizado com esta conquista. Não tenho palavras para descrever a importância de vocês em minha vida. Amo vocês!

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

Introdução: Câncer gástrico (CG) apresenta altas taxas de incidência e mortalidade no mundo, sendo a infecção persistente pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori)* um dos seus principais fatores etiológicos, uma vez que promove inflamação crônica e a expressão de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF)-α. Esta citocina é um mediador chave entre inflamação e câncer, induzindo múltiplas respostas celulares por meio de dois receptores: TNFR1 e TNFR2. Ambos os receptores podem desencadear a sobrevivência, mas apenas TNFR1 é capaz de induzir morte celular. A regulação desta via é complexa e pode ser alterada por microRNAs (miRNAs) podendo favorecer o processo tumorigênico. **Objetivos:** a) avaliar a expressão de genes e miRNAs envolvidos na via de sinalização de TNF-α e suas relações em amostras de CG; b) construir uma rede de interação miRNAs-RNAm; c) avaliar o efeito do silenciamento dos receptores TNFR1 e TNFR2 e do tratamento com extrato da *H. pylori* (eHP), na expressão dos mesmos genes e miRNAs, bem como nos processos celulares de proliferação, ciclo celular e apoptose em linhagem de câncer gástrico. **Materiais e Método:** Total de 30 amostras provenientes de indivíduos com CG foram submetidas a PCR quantitiva (qPCR) com ensaios TaqMan®, para quantificação relativa (RQ) do RNAm de genes da via de sinalização de TNF-α (*TNFA, TNFR1, TNFR2, TRADD, TRAF2, CFLIP, NFKB1*, *NFKB2, CASP8, CASP3)* e de miRNAs que apresentam alguns destes RNAm como alvo (miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a, miR-181c). Odiagnóstico molecular da *H. pylori* foi realizado por *nested* PCR para o gene *HSP60.* Linhagens de adenocarcinoma gástrico AGS estáveis contendo os receptores TNFR1 (AGS-shR1) e TNFR2 (AGS-shR2) silenciados por shRNAs específicos e linhagem AGS não silenciada foram tratadas com 30% v/v de eHP por 6 horas. Posteriormente, foi realizada a quantificação dos mesmos RNAm e miRNAs por qPCR, ensaio MTT para avaliação da proliferação celular e citometria de fluxo para análise do ciclo celular e apoptose. **Resultados:** Nas amostras de CG houve aumento na expressão de genes pró-sobrevivência (*TNF, TNFR2, TRADD, TRAF2, CFLIP* e *NFKB2*), *CASP8* e do miR-34a, enquanto a expressão de mediadores pró-apoptóticos (*TNFR1* e *CASP3)* estava reduzida. Infecção pela *H. pylori* não influenciou a expressão dos RNAm e miRNAs nas amostras de CG. A rede de interação miRNA:RNAm mostrou possíveis interrelações entre os miRNAs analisados e os genes da via de

sinalização de TNF-α, destacando os miR-19a e miR-103a que podem regular o maior número de genes. Nos experimentos *in vitro*, AGS-shR1 apresentou redução significante na expressão de genes de sobrevivência celular (*TNFA, NFKB1* e *NFKB2*) e aumento na expressão de *CASP3,* embora não alterou a expressão de miRNAs e nem os processos celulares. Por outro lado, silenciamento parcial de TNFR2 reduziu significantemente a expressão de *TRADD* e *TRAF2*, assim como aumentou a expressão de miRNAs, suprimiu a apoptose e desencadeou parada do ciclo celular na fase G2/M. Tratamento com eHP na linhagem não silenciada, além de aumentar o número de células em necrose, aumentou a expressão dos genes *TNFR1, NFKB1, NFKB2* e *CFLIP,* e reduziu a expressão de *TNFR2,* embora expressão reduzida dos receptores tenha diminuido a intensidade da resposta ao tratamento. **Conclusão:** Portanto, nossos resultados destacam o importante papel da via de sinalização de TNF-α mediada tanto por TNFR2 como por TNFR1 em câncer gástrico. Em amostras de tecido, o efeito pró-tumoral de TNF-α deve-se a ativação da via de sinalização mediada principalmente por TNFR2. Na linhagem celular, silenciamento parcial de TNFR1 e TNFR2 reduziu a expressão de genes pró-sobrevivência e anti-apoptóticos e afetou processos celulares e expressão de miRNAs, de modo que silenciamento simultâneo dos receptores pode ter um efeito anti-tumoral em câncer gástrico. Além disto, a resposta de infecção por *H. pylori* nesta via de sinalização é mediada principalmente por TNFR1, direcionando para a via de sobrevivência celular.

Palavras-chave: câncer gástrico; via de sinalização de TNF-α; silenciamento de TNFR1; silenciamento de TNFR2; miRNAs; *Helicobacter pylori*

ABSTRACT

Introduction: *Gastric cancer (GC) has high rates of incidence and mortality in the world and persistent infection by the bacterium Helicobacter pylori (H. pylori) is one of the main etiological factors since it promotes chronic inflammation and inflammatory mediators' expression, such as tumor necrosis factor (TNF)-α. This cytokine is a key mediator between inflammation and cancer, inducing multiple cellular responses through two receptors: TNFR1 and TNFR2. Both receptors can trigger survival, but only TNFR1 is capable of inducing cell death. This pathway's regulation is complex and can be altered by microRNAs (miRNAs) which may favor the tumorigenic process.* ***Objectives****: a) to evaluate the expression of genes and miRNAs involved in TNF-α signaling pathway and their relationships in GC samples; b) to build a miRNA:mRNA interaction network; c) to evaluate the effect of TNFR1 and TNFR2 receptors silencing and treatment with H. pylori extract (eHP) on gastric cancer lineage in the expression of same genes and miRNAs, as well as in the cellular processes of proliferation, cell cycle and apoptosis.* ***Materials and Method:*** *total 30 samples from GC subjects were submitted to quantitative PCR (qPCR) with TaqMan® assay, for the relative quantification (RQ) of the TNF-α signaling pathway mRNA* (*TNFA, TNFR1, TNFR2, TRADD, TRAF2, CFLIP, NFKB1*, *NFKB2, CASP8, CASP3) and miRNAs that presented some of these mRNAs as targets (miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a, miR-181c). Molecular diagnosis of H. pylori was performed by nested PCR for gene HSP60. Stable AGS gastric adenocarcinoma lineage containing the TNFR1 (AGS-shR1) and TNFR2 (AGS-shR2) receptors downregulated by specific shRNAs and non-silenced lineage were treate with 30% v/v eHP for 6 hours. Subsequently, the same mRNA and miRNAs were quantified by qPCR, MTT assay for cell proliferation evaluation and flow cytometry for cell cycle analysis and apoptosis.* ***Results:*** *In GC samples, it was verified up-regulation of pro-survival genes (TNF, TNFR2, TRADD, TRAF2, CFLIP and NFKB2), CASP8 and miR-34a, whereas proapoptotic mediators's expression (TNFR1 and CASP3) were down-regulated. H. pylori infection did not influence the expression of mRNAs and miRNAs in GC samples. miRNA:mRNA interaction network showed several possible relationships between the analyzed miRNAs and the TNF-α signaling pathway genes, highlighting miR-19a and miR-103a which can regulate the greatest number of genes. In vitro experiments, AGS-shR1 presented significant decreased in the*

expression of survival genes (TNFA, NFKB1 and NFKB2) and increased CASP3 expression, although no changes in cellular processes and miRNAs expression were observed. In contrast, TNFR2 downregulation significantly decreased TRADD and TRAF2 expression, as well as increased the miRNAs expression, supressed apoptosis and promoted cell-cycle arrest at G2/M. The treatment with eHP in non-silenced lineage, besides increasing the amount of necrosis cells, increased expression of genes TNFR1, NFKB1, NFKB2 and CFLIP, and decreased of TNFR2, however the receptors downregulation decreased treatment response intensity. ***Conclusion:*** *Therefore, our results highlight the important role of the TNF-α signaling pathway mediated by both TNFR2 and TNFR1 in gastric cancer. In gastric samples, the pro-tumor effect of TNF-α is mainly due to activation of the TNFR2-mediated signaling pathway. In AGS cell line, TNFR1 and TNFR2 downregulation decrease expression of pro-survival and anti-apoptotic genes and affected cellular processes and miRNA expression, so that simultaneous silencing of both TNFR1 and TNFR2 may have an antitumor effect on gastric cancer. In addition, H. pylori infection response in this signaling pathway is mediated mainly by TNFR1, directing to the cellular survival pathway.*

Key-words: Gastric cancer, TNF-α signaling pathway; TNFR1 knockdown; TNFR2 knockdown; miRNAs; *Helicobacter pylori*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência morfológica, alterações genéticas e epigenéticas na carcinogênese gástrica multiestágios 22

Figura 2. Patogênese de infecção pela *Helicobacter pylori* e resposta imune do hospedeiro.....24-25

Figura 3. Modelo da apoptose mediada por TNFR1.....28-29

Figura 4. Complexo I de TNFR1 contem RIP1 ubiquitinado e ativa NF-κB e a sinalização JNK e p38 30

Figura 5. Representação esquemática da via canônica da biogênese de miRNAs e atividade do complexo RISC.....34

Figura 6. miRNAs envolvidos na carcinogênese gástrica e terapia 36-37

Lista de figuras Capítulo I

Figure 1. Relative expression of tumor necrosis factor-α pathway genes in gastric cancer ……65

Figure 2. Relative expression of miRNAs miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a and miR-181c in gastric cancer ……..……..…66

Figure 3. Relative expression of miRNAs mir-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a and miR-181c in intestinal and diffuse types of gastric cancer ……..…67

Figure 4. Interaction network showing miRNAs and their predicted and validates targets ……68

Figure 5. Tumor necrosis factor-α signaling in gastric cancer ……..69

Lista de figuras Capítulo II

Figure 1. Downregulation of TNFR1 (a) and TNFR2 receptors (b) in AGS cell line……93

Figure 2. Relative expression of TNF-α signaling pathway genes ……..……94

Figure 3. Relative expression of miRNAs related to TNF-α pathway ……..……95

Figure 4. TNFR2 downregulation leads to cell-cycle arrest at G2/M phase……...96

Figure 5. Apoptosis analysis in non-silenced AGS, downregulated for TNFR1 (AGS-shR1), downregulated for TNFR2 (AGS-shR2) without treatment (C) and treated with extract of *H. pylori* (eHP)…….97

Figure S1. Relative expression of *TNFA, TNFR1* and *TNFR2* genes in AGS and HGC-27 gastric cancer cell lines ……..….98

Figure S2. Relative gene expression of *TNFA* in the AGS cell line after treatment with *H. pylori* extract (eHP) at the incubation time of 4, 6 and 24 hours and in the eHP volumes of 50 and 100 µL ……..……..98

Figure S3. Relative gene expression of *TNFA* in the AGS cell line after treatment with *H. pylori* extract (eHP) volumes of 100, 150 and 200 µL for 6 hours ……...99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. miRNAs com atuação na carcinogênese gástrica e via de sinalização de TNF-α 38

Lista de tabelas Capítulo I

Table 1. Characterization of individuals with normal mucosa and gastric cancer ….70

Table 2. Correlation analysis between mRNA expression and tumor necrosis factor-α pathway genes in gastric cancer.....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACTB	do inglês *Actin beta*
Ago 2	do inglês *argonaute RISC catalytic component 2*
AGS-shR1	Linhagem celular AGS silenciada para o gene *TNFR1*
AGS-shR2	Linhagem celular AGS silenciada para o gene *TNFR1*
APC	do inglês *APC regulator of WNT signaling patway*
ARID1A	do inglês *AT-rich interaction domain 1A*
APE1	do inglês *apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1*
BabA	do inglês *blood group antigen-binding adhesion*
bp	do inglês *base pairs*
CG	Câncer Gástrico
cDNA	DNA complementar
cFLIP	do inglês *CASP8 homolog FLICE-inhibitory protein* (gene CFLIP/CFLAR)
CASP3	do inglês *caspase 3*
CASP8	do inglês *caspase 8*
CpG	Regiões do DNA com grande quantidade de bases nitrogenadas C e G
CD44	do inglês *CD44 molecule (Indian blood group)*
CDH1	do inglês *cadherin 1*
CagA	Citotoxina A
c-IAP	do inglês *cellular inhibitor of apoptosis protein*
CD4+	Glicoproteína de membrana presente em linfócitos T
DNA	do inglês *desoxirribonucleic acid*
DISC	do inglês *death inducing signaling complex*
DD	do inglês *death domain*
DMEM	do inglês *Dulbecco's modified Eagle medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
eHP	Extrato da bactéria *Helicobacter pylori*
EGFR	do inglês *epidermal growth factor receptor*
ERBB2	do inglês *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*
ERBB3	do inglês *erb-b2 receptor tyrosine kinase 3*
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ECL	do inglês *enhanced chemiluminescence*
et al	e outros, do latim et al
FGFR2F	do inglês *fibroblast growth factor receptor 2*

FBS	Soro Fetal Bovino
FITC	do inglês *fluorescein isothiocyanate*
FADD	do inglês *Fas-associated death domain*
GC	do inglês *Gastric Cancer*
GAPDH	do inglês *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
G418	Geneticina
g	ou RCF, do inglês *Relative Centrifugal Force*
Gna14	do inglês *guanine nucleotide binding protein, alpha 14*
H. pylori	*Helicobacter pylori*
H2AX	do inglês *H2A histone family member X*
IARC	do inglês *International Agency for Research on Cancer*
IMS	Instabilidade de microssatélite
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-1β	Interleucina-1 Beta
IL2	do inglês *interleukin 2*
IL12A	do inglês *interleukin 12A*
IFITM1	do inglês *interferon induced transmembrane protein 1*
IκB-α	do inglês *Inhibitor of NF-κB α*
IKK	do inglês *IκB kinase*
JNK	do inglês *c-Jun N-terminal kinase*
KRAS	do inglês *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
LOH	do inglês *loss of heterozygosity*
LPS	Lipopolissacarídeo
LUBAC	do inglês *linear ubiquitin assembly complex*
miRNAs	microRNAs
mRNA	do inglês *messenger RNA*
MTT	do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
MLL	ou *KMT2A,* do inglês *lysine methyltransferase 2A*
MDM2	MDM2 proto-oncogene
MET	MET proto-oncogene, *receptor tyrosine kinase*
mTNF	Fator de necrose tumoral ligado à membrana
MRX34	Mimético do miR-34a
min	Minutos
NF-κB	do inglês *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*

NFKB1	do inglês *nuclear factor kappa B subunit 1*
NFKB2	do inglês *nuclear factor kappa B subunit 2*
NRAS	NRAS proto-oncogene
NK	Células Natural Killer
Noxo1	do inglês *NADPH oxidase organizer 1*
nm	Nanômetros (unidade de comrpimento: 10^{-9} metro)
pH	potencial hidrogeniônico
p	Probabilidade
p27	ou *PSMD9,* do inglês *proteasome 26S subunit, non-ATPase 9*
PIK3CA	do inglês *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subur alpha*
p38	ou *MAPK14,* do inglês *mitogen-activated protein kinase 14*
Pré-miRNAs	microRNA precursor
Pri-miRNAs	microRNA primário
PPI	do inglês *protein-protein interaction*
PI3K/AKT	do inglês *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subur beta / AKT serine/threonine kinase 1*
PVDF	do inglês *polyvinylidene difluoride*
PI	do inglês *propidium iodide*
PCR	do inglês *polymerase chain reaction*
PARP-1	do inglês *poly(ADP-ribose) polymerase 1*
pH2AX	H2AH fosforilado
qPCR	do inglês *quantitative polymerase chain reaction*
r	Coeficiente de Correlação
Ran-GTP	do inglês *ras-related nuclear protein – Guanosine-5'-triphosphate*
RISC	do inglês *RNA-induced silencing complex*
RNA	do inglês *ribonucleic acid*
RNAm	RNA mensageiro
RQ	do inglês *relative quantification*
RT	do inglês *reverse transcriptase*
RHOA	do inglês *ras homolog Family member A*
RIP1	do inglês *receptor interacting serine/threonine kinase 1*
REG3A	do inglês *regenerating Family member 3 alpha*
shRNA	do inglês *short hairpin RNA*
sTNF	Fator de necrose tumoral solúvel
TNF-α	do inglês *tumor necrosis factor alpha* (Gene: *TNFA*)

TNFR1	ou TNFRSF1A, do inglês *TNF receptor superfamily member 1A* (Gene *TNFR1*)
TNFR2	ou TNFRSF1B, do inglês *TNF receptor superfamily member 1B* (Gene *TNFR2*)
TRADD	do inglês *TNF receptor-associated with a death domain* (Gene *TRADD)*
TRAF2	do inglês *TNF receptor associated factor 2* (Gene *TRAF2)*
TRAF1	do inglês *TNF receptor associated factor 1*
TRAF5	do inglês *TNF receptor associated factor 5*
TP53	do inglês *tumor protein p53*
TERT	do inglês *telomerase reverse transcriptase*
TGFBRI	do inglês *transforming growth factor, beta receptor I*
TLR2	do inglês *toll like receptor 2*
TLR4	do inglês *toll like receptor 4*
TACE	enzima conversora de TNF-α
Treg	Células T regulatórias
TGF-β	do inglês *transforming growth factor beta 1*
TRBP	do inglês *transactivation responsive RNA binding protein*
v/v	Relação volume/volume
VEGFA	do inglês *vascular endotelial growth factor A*
VEGFR2	ou *KDR,* do inglês *kinase insert domain receptor*
VacA	Citotoxina vacuolizante
Δ	Delta
®	marca registrada
°C	graus Celsius (medida de temperatura)
µL	microlitro (unidade de volume: 10^{-6} litro)
3'-UTR	do inglês *3' untranslated*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

1.1 Câncer Gástrico 20

1.2 Inflamação: *Helicobacter pylori* e câncer gástrico 22

1.3 Via de sinalização do fator de necrose tumoral (TNF)-α: sobrevivência ou morte celular 26

1.4 MicroRNAs: inflamação e câncer..... 31

2 OBJETIVOS 39

3 CAPÍTULO I – Up-regulation of tumor necrosis factor-α pathway survival genes and of the receptor TNFR2 in gastric cancer 40

Abstract 43
Introduction 45
Materials and Methods 46
Results 48
Discussion 50
Conclusions..... 54
Article Highlights..... 54
References 56
Figures..... 65
Tables..... 70

4 CAPÍTULO II - TNFR1 and TNFR2 downregulation decrease survival gene expression and affect cellular fate in gastric cancer cells 72

Abstract 74
Introduction 75
Methods 76
Results 80
Discussion 83
References 87
Figures 93
Supplementary materials..... 98

5 DISCUSSÃO 100

6 CONCLUSÕES..... 109

REFERÊNCIAS..... 110

ANEXO A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa 121

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer gástrico

O câncer gástrico (CG) é a quinta neoplasia mais comum e a terceira em causa de morte relacionada ao câncer em ambos os sexos mundialmente (GLOBOCAN, 2018). A incidência varia em diferentes regiões geográficas, apresentando alta incidência na Ásia e Europa Oriental, bem como na América Latina (GLOBOCAN, 2018). No Brasil estima-se 13.540 novos casos deste tipo de câncer em homens e 7.750 em mulheres em 2019, sendo o quarto em incidência entre os homens e o sexto entre as mulheres (INCA, 2018). Embora a incidência e a mortalidade tenham diminuído ao longo dos anos, a maioria dos casos são diagnosticados em estágio avançado, o que resulta em pior prognóstico com taxa de sobrevivência dos pacientes menor que 40% após cirurgia e terapia (McLEAN; EL-OMAR, 2014; LIU; MELTZER, 2017). Portanto, melhorar o conhecimento acerca da patogênese do câncer gástrico é necessário, a fim de obter o diagnóstico em estágios iniciais e aumentar o sucesso terapêutico com estratégias menos tóxicas e mais efetivas (LIU; MELTZER, 2017).

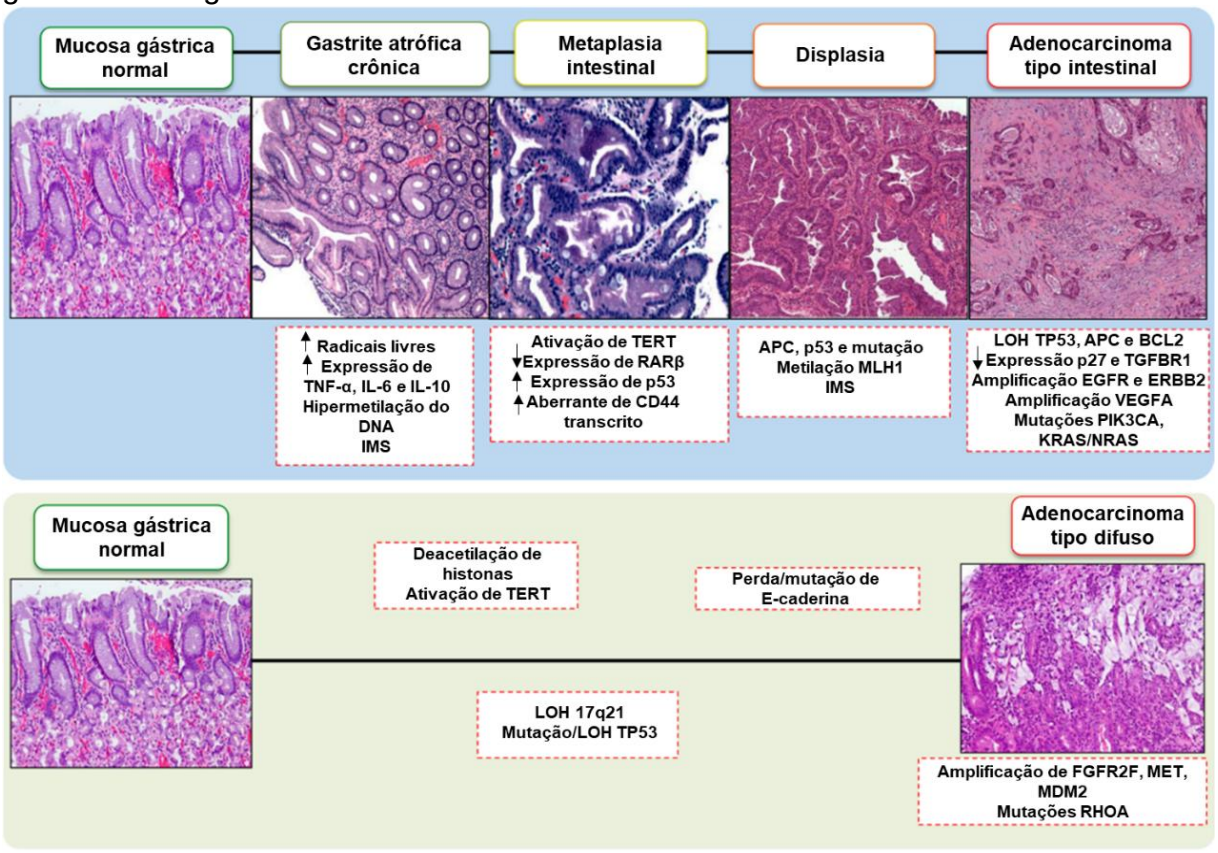
A neoplasia de estômago é uma doença heterogênea com diferentes fenótipos e prognósticos (OUE et al., 2019). Com relação a localização anatômica, um terço de todos os cânceres gástricos são diagnosticados na cárdia, região localizada próxima a junção gastro- esofágica, e os demais surgem na região distal do estômago (LOTT; CARVAJAL-CARMONA, 2018). Além disto, histologicamente, CG foi classificado em dois subtipos principais por apresentarem características clínicas distintas: intestinal e difuso (LAUREN,1965) (**Figura 1**). O tipo intestinal apresenta semelhança com a mucosa intestinal devido a formação de glândulas com junções intercelulares (LOTT; CARVAJAL-CARMONA, 2018) e desenvolve-se em um processo multiestágios denominado “Cascata de Correa”, o qual inicia com inflamação promovendo a gastrite crônica, que progride para atrofia gástrica, metaplasia intestinal, displasia e câncer (CORREA, 1975). Por outro lado, no tipo difuso, as células perdem a coesão e formam aglomerados que infiltram no estroma (LOTT; CARVAJAL-CARMONA, 2018), surgindo a partir da mucosa gástrica normal (BARBER et al., 2008). Recentemente, sistemas de classificação molecular tem sido propostos, uma vez que as classificações anatômica e histológica não refletem as características genéticas do câncer gástrico (OUE et al., 2019). Assim, a rede de

pesquisa do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) classificou esta neoplasia em quatro subtipos moleculares: CG positivo para o vírus Epstein-Barr (tipo EBV), CG com instabilidade de microssatélite l (tipo MSI), CG genomicamente estável (tipo GS) e CG com instabilidade cromossomal (tipo CIN) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

CG é uma neoplasia multifatorial, de modo que durante seu desenvolvimento há a participação de diferentes fatores genéticos e ambientais (LIU; MELTZER, 2017). De modo geral, as alterações genéticas incluem ganho ou perda cromossômica, mutações em oncogenes e genes supressores de tumor e polimorfismos genéticos, bem como alterações epigenéticas de metilação do DNA, modificação de histonas e alteração na expressão de microRNAs (miRNAs), as quais foram relacionadas a iniciação e progressão do CG (LIU; MELTZER, 2017; NECULA et al., 2019). Por outro lado, os fatores de risco ambientais incluem tabagismo, etilismo, obesidade, refluxo gastro-esofágico, dietas ricas em nitratos (sal e comidas defumadas, por exemplo), e principalmente a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (LIU; MELTZER, 2017; RIVAS-ORTIZ et al., 2017; LOTT; CARVAJAL-CARMONA, 2018).

Os estágios iniciais da carcinogênese do tipo intestinal são caracterizados por instabilidade genética, ativação da telomerase, mutação/perda de *TP53,* além de inativação de genes supressores de tumor e miRNAs por metilação de ilhas CpG. Ativação de *TERT,* perda na expressão do receptor β de ácido retinóico, superexpressão de *TP53* e presença anormal de transcritos CD44 caracterizam a metaplasia intestinal, enquanto na displasia são encontradas mutações no gene *APC* e instabilidade de microssatélite. Além disto, em adenocarcinoma do tipo intestinal, observa-se expressão reduzida de TGFBR1 e completa perda de função de p27, mutações em genes de receptores tirosina-quinase (*EGFR, ERBB2, ERBB3*), amplificação de *VEGFA, PIK3CA* e *KRAS/NRAS,* bem como mutações em genes de remodelação da cromatina, como *ARID1A, MLL3* e MLL (**Figura 1**) (RIQUELME et al., 2015). Diferentemente, as principais mudanças moleculares observadas no adenocarcinoma do tipo difuso incluem instabilidade de microssatélites, perda da função da E-caderina devido a deleções ou mutações em *CDH1,* amplificação de *MDM2, MET* e *FGFR2F,* além de mutações em *RHOA* (**Figura 1**) (RIQUELME et al., 2015).

Figura 1 - Sequência morfológica, alterações genéticas e epigenéticas na carcinogênese gástrica multiestágios. Esta figura sumariza a sequência de eventos moleculares que caracterizam câncer gástrico tipo intestinal e tipo difuso de acordo com o modelo da cascata de Correa. IMS: instabilidade de microssatélite; LOH: perda de heterozigosidade (do inglês: *loss of heterozygosity*); TNF: fator de necrose tumoral; IL: interleucina; *TERT:* transcriptase reversa da telomerase*; RARβ:* receptor β de ácido retinóico; *TP53*: proteína tumoral p53*; APC:* regulador APC da via de sinalização de *WNT*; *MLH1:* mutL homólogo 1; *BCL2:* regulador apoptótico BCL2; p27: do inglês *proteasome 26S subunit, non-ATPase 9; TGFBR1:* receptor 1 do fator de crescimento transformador beta; *EGFR:* receptor do fator de crescimento epidermal; *ERBB2:* receptor do fator de crescimento epidermal humano 2; *VEGFA:* fator de crescimento endotelial vascular A; *PIK3CA:* fosfatidilinositol-3-cinase; *KRAS:* homólogo do oncogene viral de sarcoma de rato Kirsten; *NRAS:* proto-onocogene NRAS; *FGFR2F:* receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos; *MET:* receptor tirosino-cinase; *MDM2:* proto-oncogene MDM2; *RHOA:* membro A da família de genes homólogos de Ras.



FONTE: Modificada de RIQUELME et al., 2015.

1.2 Inflamação: *Helicobacter pylori* e câncer gástrico

A inflamação é uma resposta benéfica ativada para combater agentes patogênicos e restaurar lesão tecidual. Entretanto, se a inflamação ocorre de maneira desregulada e torna-se crônica, pode induzir a transformação maligna celular no tecido adjacente (LANDSKRON et al., 2014). Em câncer gastrointestinal, foi estabelecido que a resposta inflamatória possui um papel promotor de tumor

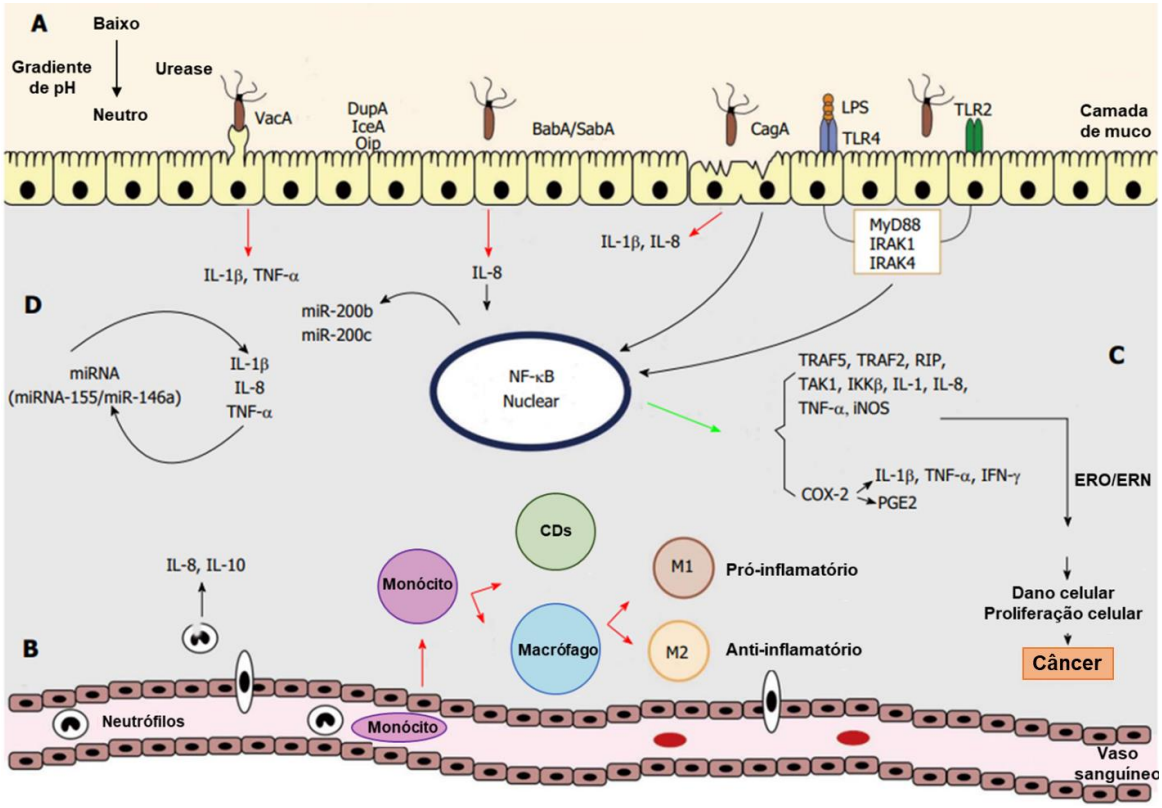
(ECHIZEN et al., 2018). Na inflamação crônica, células inflamatórias e epiteliais produzem grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), além de fornecer moléculas bioativas, como citocinas, fatores de crescimento, sinais de sobrevivência e fatores pro-angiogênicos (LANDSKRON et al., 2014; MURATA, 2018). ERO e ERN causam alterações em ácidos nucléicos, proteínas e lipídios resultando em danos tissulares que favorecem o surgimento de câncer (MURATA, 2018). A exposição a radicais livres e citocinas pró-inflamatórias induz alterações genéticas e epigenéticas no genoma, incluindo mutações, aumento ou redução na metilação do DNA, além de desregulação na expressão de microRNAs (MURATA, 2018).

Agentes infecciosos causadores de inflamação crônica estão associados à cerca de 10-15% dos cânceres (CHIBA; MARUSAWA; USHIJIMA, 2012) como colorretal, de bexiga, hepático, pancreático, de pulmão e o câncer gástrico (NAGANO et al., 2019). Estudos epidemiológicos relataram que 2-3% dos indivíduos infectados por *H. pylori* desenvolvem CG (WANG et al., 2014), sendo considerado o principal agente de risco para o desenvolvimento desta neoplasia, o que levou a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) classificá-la como um carcinógeno classe I em 1994 e reafirmar esta classificação em 2009 (IARC, 2012).

H. pylori é uma bactéria gram-negativa, flagelada e microaerófila com grande habilidade para colonizar o estômago humano (SALAMA; HARTUNG; MÜLLER, 2013; DÍAZ et al., 2018). Embora a prevalência varie com a região geográfica, idade e nível socioeconômico, a média global de infecção por esta bactéria é cerca de 58% e a maioria dos indivíduos infectados são assintomáticos (WANG et al., 2014). Isto se deve as estratégias de sobrevivência únicas da *H. pylori* e a sua habilidade de escapar do sistema imune do hospedeiro (ESLAMI et al., 2019). Dentre as estratégias, destacam-se a presença da enzima urease capaz de aumentar o pH gástrico e uma variedade de fatores de virulência que podem desregular vias de sinalização intracelular do hospedeiro e estimular células da imunidade inata, favorecendo a transformação neoplásica (WANG et al., 2014; KALALI et al., 2014). Dentre os fatores bacterianos de risco envolvidos nesses processos estão as proteínas CagA e VacA e a adesina BabA (ALFAROUK et al., 2019), sendo que cepas triplo positivas ($VacA^+$, $CagA^+$, $BabA^+$) exibem maior densidade de colonização e intensa resposta inflamatória no tecido gástrico (CHANG; YEH; SHEU, 2018).

Infecção persistente da mucosa gástrica pela *H. pylori* promove inflamação crônica originando a gastrite, podendo progredir para lesões pré-neoplásicas (DÍAZ et al., 2018). Após o reconhecimento da bactéria pelas células epiteliais gástricas, *H. pylori* desencadeia uma cascata inflamatória pela ativação de quimiocinas, recrutamento de macrófagos, células dendríticas e polimorfonucleares, resultando em liberação de mediadores inflamatórios, como Interleucinas (IL)-6, IL-8, IL1-β e fator de necrose tumoral (TNF)-α, além de fatores de sobrevivência e proliferação celular (**Figura 2**) (CADAMURO et al., 2014; YOUSEFI et al., 2019). Em sequência, ocorre ativação da sinalização do fator de transcrição nuclear (NF)- kB, que é um regulador vital da inflamação e resulta em proliferação e inibição da apoptose, podendo afetar a transformação neoplásica destas células (YOUSEFI et al., 2019). A resposta inflamatória induzida por esta bactéria, como já descrito, também ocasiona a liberação de compostos mutagênicos, como ERO e ERN, que aumentam os níveis de danos no DNA e desregulação epigenética, favorecendo o processo carcinogênico (RIVAS-ORTIZ et al., 2017).

Figura 2 - Patogênese de infecção pela *Helicobacter pylori* e resposta imune do hospedeiro. A: A colonização das células gástricas epiteliais por esta bactéria é possível pela presença da enzima urease que neutraliza o pH. Por meio de BabA e SabA ocorre a adesão desta bactéria as células epiteliais o que permite a liberação dos fatores de virulência CagA e VacA no interior das células do hospedeiro, causando uma forte resposta imune sistêmica e inflamação da mucosa gástrica. Além disto, o LPS bacteriano é reconhecido pelos receptores TLR2 e TLR4 que, em associação com MyD88/IRAK1/IRAK4 leva a ativação do fator de transcrição NF- kB, ativando vias de sinalização inflamatória. **B:** A resposta imune é ativada com o recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção, induzindo a produção de vários mediadores pró e anti-inflamatórios. **C:** Após a ativação de NF- kB ocorre a rápida expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e interleucinas, além da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), estimulando vias oncogênicas que podem levar ao câncer. **D:** A expressão de alguns miRNAs é alterada pela infecção, o que regula a resposta imune do hospedeiro.



FONTE: Modificada de CADAMURO et al., 2014.

Em consequência da infecção por *H. pylori* a resposta inflamatória do hospedeiro é acompanhada pela desregulação da expressão de genes envolvidos na resposta imune e inflamatória, controle da cinética celular e miRNAs, como observado em nossos estudos prévios (CADAMURO et al., 2014; CADAMURO et al., 2015; ROSSI et al., 2016). Dentre os mediadores inflamatórios que são modulados por este patógeno destaca-se TNF-α, cuja expressão aumentada foi observada em gastrite crônica (ROSSI et al., 2016), úlcera péptica (GOLL et al., 2007) e câncer gástrico (ZHAO et al., 2010) associado à *H. pylori*. Diversos estudos mostraram que TNF-α é um mediador chave entre inflamação e câncer (SETHI et al., 2008; BALKWILL, 2009; OSHIMA et al., 2014), agindo como um fator promotor tumoral e influenciando todas as etapas da tumorigênese, incluindo transformação, proliferação, angiogênese, invasão e metástase (BALKWILL, 2009; HAM et al., 2016). Isto deve-se as múltiplas respostas intracelulares induzidas por esta citocina que resulta em processos celulares diversos, como apoptose e sobrevivência celular, características tipicamente desreguladas no câncer, tornando TNF-α um importante alvo de estudo no contexto da carcinogênese gástrica.

1.3 Via de sinalização do fator de necrose tumoral (TNF)-α: sobrevivência ou morte celular

TNF-α é uma citocina pró-inflamatória pleiotrófica importante na sinalização dos sistemas imune inato e adaptativo, inflamação e morte celular (BRENNER; BLASER; MAK, 2015). Esta citocina foi identificada a partir de pacientes com câncer que entravam em remissão após apresentarem algum tipo de infecção bacteriana, e então descrita como fator de necrose tumoral pela sua capacidade de induzir a morte de células tumorais (JOSEPHS et al., 2018). Esta citocina é inicialmente sintetizada como uma proteína transmembrana tipo II (JONES; STUART; WALKER, 1989), sendo a forma solúvel clivada a partir da forma ligada a membrana (mTNF) por uma metaloproteinase conhecida como enzima conversora de TNF-α - TACE (ou ADAM17) - dando origem ao peptídeo solúvel extracelular (BLACK et al., 1997). A expressão de mTNF ou a liberação do peptídeo solúvel (sTNF) ocorre em resposta a diversos estímulos e são processos rigorosamente regulados (BRENNER; BLASER; MAK, 2015). Os macrófagos ativados são a principal fonte desta citocina, assim como linfócitos e células natural killer (NK), embora células não-imunes como fibroblastos, queratinócitos e células tumorais contribuem para a sua produção (WU; ZHOU, 2010; ZHAO et al., 2010; JOSEPHS et al., 2018). De modo geral, TNF-α possui papel importante tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, regulando diversas respostas celulares como comunicação celular, produção de outras citocinas inflamatórias, além de sobrevivência, proliferação e morte celular (BRENNER; BLASER; MAK, 2015; YANG et al., 2018a). Em decorrência de seu efeito regulatório em processos celulares distintos, alterações na sua via de sinalização estão relacionadas com doenças autoimunes e câncer (BRENNER; BLASER; MAK, 2015).

A diversidade de efeitos biológicos resultante da ação de TNF-α deve-se a possibilidade de ativação da sua via de sinalização por meio de dois receptores de membrana distintos: TNFR1 (ou TNFRSF1A) ou TNFR2 (TNFRSF1B) (FAUSTMAN; DAVIS, 2013). Ambos os receptores são proteínas transmembranas com alta similaridade na estrutura extracelular de ligação de TNF, mas diferem nos seus domínios intracelulares, visto que apenas TNFR1 apresenta “domínio de morte” (CABAL-HIERRO et al., 2014; JOSEPHS et al., 2018). TNFR1 é expresso em quase todas as células de mamífero, assim como células tumorais, e pode ser ativado tanto

por mTNF quanto por sTNF, enquanto a expressão de TNFR2 é mais limitada, restrita principalmente a células do sistema imune, como células T regulatórias (Treg) e células endoteliais, sendo que sua ativação completa é iniciada apenas por mTNF (JOSEPHS et al., 2018; YANG et al., 2018a), atuando na modulação do sistema imune e regeneração tecidual. Como consequência disto, TNFR1 é considerado o principal mediador da via de sinalização induzida por TNF-α, dirigindo predominantemente a resposta pró-inflamatória (NAUDÉ et al., 2011).

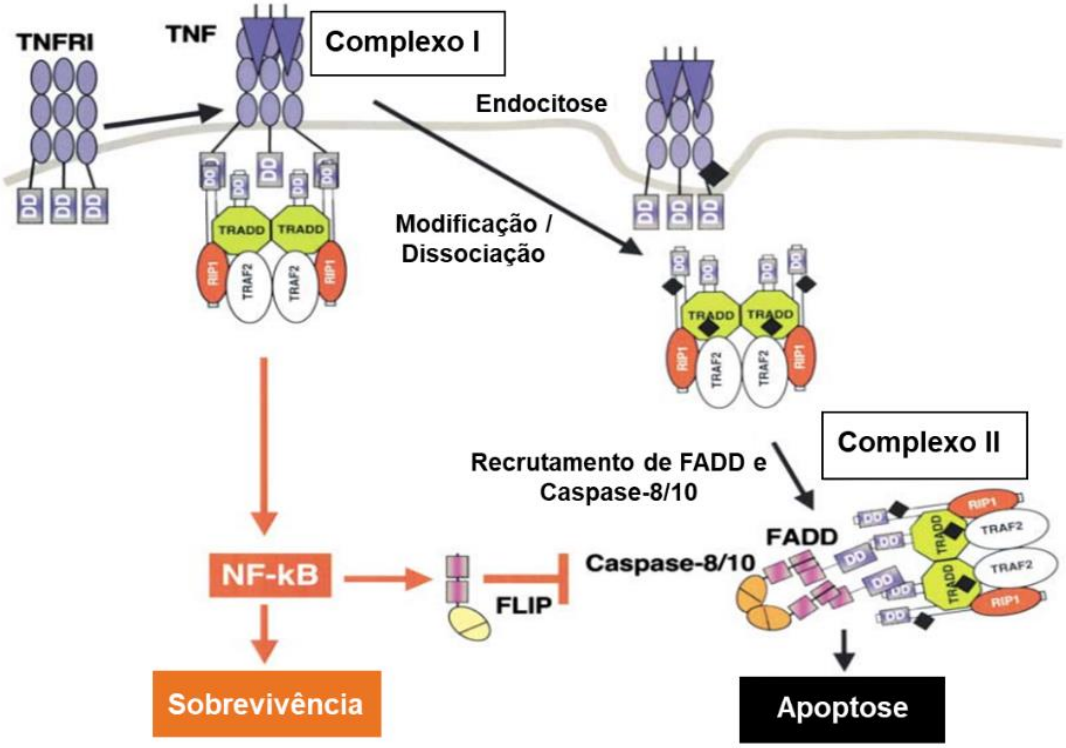
Sinalização de TNF-α desencadeada por ligação com TNFR1 é capaz de induzir duas respostas celulares diferentes: a sobrevivência celular e promoção da inflamação ou a morte celular por apoptose. O balanço entre estas duas vias depende de muitos fatores, como o tipo celular, microambiente intra e extracelular, além da concentração de mediadores pró e anti-apoptóticos (YANG et al., 2018a). Após ligação de TNF-α, TNFR1 sofre mudanças conformacionais que resultam no recrutamento das proteínas TRADD (*TNF receptor-associated with a death domain*) e RIP1 (*receptor-interacting protein 1*). Ambas possuem domínio de morte e são capazes de interagir independentemente com TNFR1 e fortemente entre si, dando integridade a este complexo. Posteriormente, TRADD, que possui um sítio de ligação específico, recruta TRAF2 (*TNF receptor associated factor*) e a este ligam-se as proteínas inibidoras de apoptose c-IAP1 e 2 (*cellular inhibitor of apoptosis protein*). Este complexo de sinalização de TNFR1 associado a membrana é denominado Complexo I e resulta na ativação de NF-κB (*nuclear factor- κB*) e JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (**Figuras 3 e 4**) (revisão em BRENNER; BLASER; MAK, 2015; JOSEPHS et al., 2018). De uma maneira dependente de TRAF-2/c-IAP, RIP1 é ubiquitinado desencadeando ativação e consequente degradação proteossomal do complexo IKK (*IκB kinase*), liberando o fator de transcrição NF-κB, o qual se transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes anti-apoptóticos e pró-sobrevivência, como c-IAP1, c-IAP2, cFLIP (*CASP8 homolog FLICE-inhibitory protein*), TRAF1 e TRAF2 (revisão em NAUDÉ et al., 2011; WAJANT; SCHEURICG, 2010). O complexo I, embora rapidamente montado, é transitório e, com isto, a ativação de NF-κB mediada por TNFR1 ocorre em poucos minutos e se normaliza em poucas horas (NAUDÉ et al., 2011).

O complexo II forma-se após endocitose de TNFR1 e consequente dissociação de TRADD, deixando o domínio de morte desta proteína adaptadora disponível. FADD (*Fas-associated death domain*) e procaspase-8 são

posteriormente recrutadas originando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC) (**Figura 3**). No entanto, a atividade deste complexo é inibida pela presença de c-IAP1 e 2, cFLIP, um potente inibidor da ativação de caspase-8, ou pela presença de ubiquitinação de RIP1 (NAUDÉ et al., 2011; BRENNER; BLASER; MAK, 2015). Na ausência destas condições, a procaspase-8 presente no complexo II sofre clivagem proteolítica resultando na liberação de Caspase-8 ativada e consequente ativação de Caspase-3, uma caspase efetora que cliva diretamente inúmeras proteínas celulares desencadeando a morte celular por apoptose (revisão em LEONARD; JONHSON, 2018). Portanto, a regulação da transdução de sinal desencadeada por TNF-α/TNFR1 é um constante balanço entre as funções opostas de sobrevivência e morte celular na intenção de manter a homeostase, e desequilíbrio nesta balança devido a alteração na expressão dos receptores, do ligante e de mediadores pró e anti-apoptóticos podendo favorecer o processo tumorigênico (BRENNER; BLASER; MAK, 2015).

Uma outra via de morte celular, a necrose ou necroptose, pode ser ativada pela ligação de TNF-α/TNFR1. Quando RIP1 não está ubiquitinado, ele se dissocia do Complelxo I ligado a membrana para formação do Complexo II, quando sofre clivagem pelo heterodímero formado por procaspase-8 - $cFLIP_L$ (isoforma longa), levando a morte celular por apoptose devido a sua inativação. Entretanto, se RIP1 está deubiquitinado e as caspases estão inativas, tal que RIP1 não pode ser clivado e inativado pelo heterodímero, o programa de morte celular muda de apoptose para necrose. Além disto, expressão elevada de $cFLIP_S$ (isoforma curta) também favorece a necrose, uma vez que o heterodímero formado por procaspase-8 - $cFLIP_S$ é completamente inativo cataliticamente, sendo incapaz de inativar RIP1 (BRENNER; BLASER; MAK, 2015).

Figura 3 - Modelo da apoptose mediada por TNFR1. Após a ligação de TNF a TNFR1, rápido recrutamento de TRADD, RIP1 e TRAF2 ocorre, formando o Complexo I. Posteriormente, TNFR1, TRADD e RIP1 sofrem modificações com consequente dissociação entre TNFR1 e TRADD. O domínio de morte (DD) de TRADD (e/ou RIP1) livre liga-se ao FADD, resultando em recrutamento de Caspase-8/10 originando o Complexo II que pode levar a apoptose. Se a ativação de NF-κB desencadeada pelo Complexo I está ocorrendo, os níveis de cFLIP são elevados, acarretando bloqueio da apoptose e consequente sobrevivência celular.

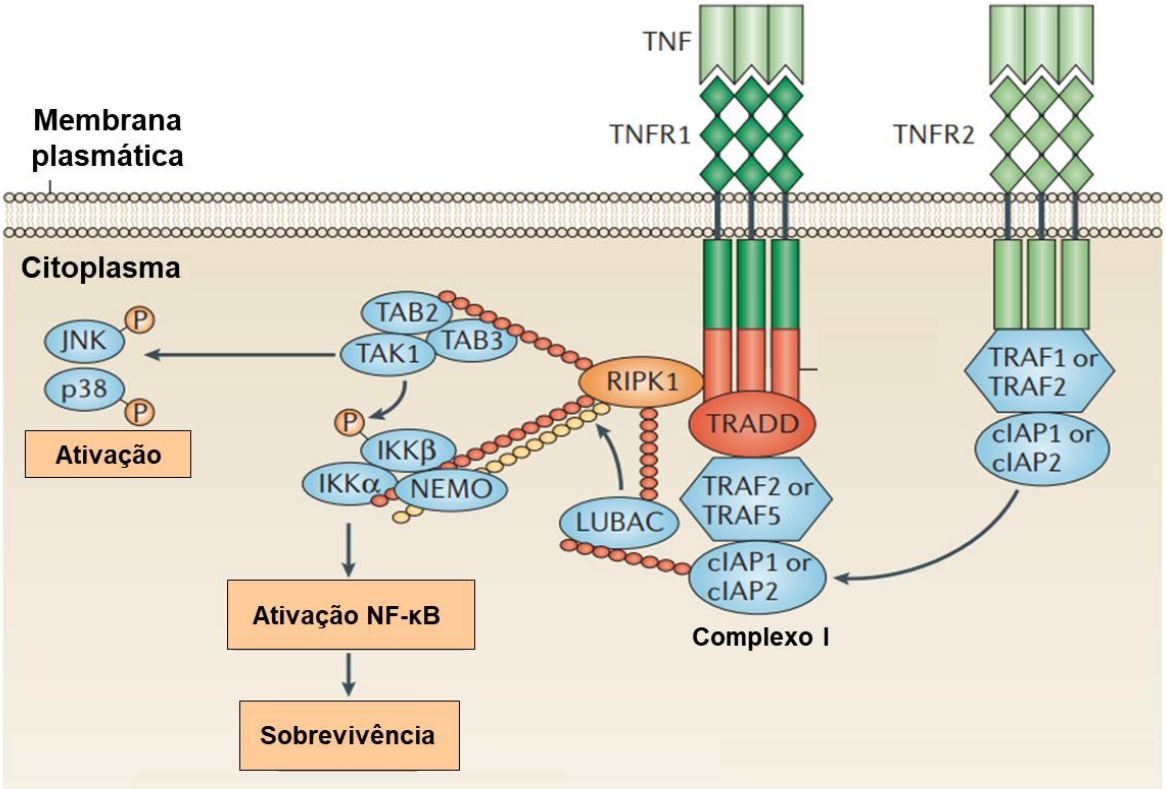


FONTE: Modificado de MICHEAU; TSCHOPP, 2003.

Ao contrário de TNFR1, TNFR2 é preferencialmente ativado por mTNF e induz ativação de NF-κB de longa duração (NAUDÉ et al., 2011). A sinalização desencadeada por este receptor é promovida pela sua interação direta com TRAF2, sendo esta proteína um mediador chave da ativação de NF-κB por esta via de sinalização (**Figura 4**) (ROTHE et al., 1995). No entanto, ativação de TNFR2 resulta em alteração na localização subcelular de TRAF2, o que induz sua degradação, inibindo a ativação de NF-κB e a consequente diminuição de vias anti-apoptóticas (NAUDÉ et al., 2011; QU; ZHAO; LI, 2017). Com isto, a degradação de TRAF2 mediada por TNFR2 pode resultar em aumento na citotoxidade desencadeada por TNFR1 quando ambos os receptores estão expressos e ativados (RODRIGUEZ et al., 2011; QU; ZHAO; LI, 2017). Por outro lado, embora as vias desencadeadas por ambos os receptores compartilham proteínas intracelulares, a cinética da sinalização de NF-κB difere entre eles, uma vez que TNFR1 ativa este fator de transcrição rapidamente e TNFR2 mantém a ativação por mais tempo, funcionando como um mecanismo regulatório para prevenir a apoptose em células coexpressando os receptores (revisão em NAUDÉ et al., 2011). Portanto, a comunicação entre os receptores pode ter tanto efeitos antagonistas quanto agonistas na via de

sinalização, de modo que a expressão de TNFR1 e TNFR2, bem como o nível relativo destes receptores na superfície celular e o grau de ativação, tem um papel importante na determinação do destino da célula (BRENNER; BLASER; MAK, 2015).

Figura 4 - Complexo I de TNFR1 contem RIP1 ubiquitinado e ativa NF-κB e a sinalização JNK e p38. Após a ligação de TNF a TNFR1, TRADD, RIP1 e TRAF2 (ou TRAF5) formam o Complexo I, ao qual se associam cIAP1 e cIAP2. TRAF2 (ou TRAF1) liga-se diretamente a TNFR2 e recrutam cIAP1 e cIAP2. Estes inibidores celulares de apoptose são responsáveis pela ubiquitinação de RIP1 e outros componentes da via, assim como ao recrutamento de LUBAC, complexo que também contribui para a ubiquitinação. Por diferentes mediadores, as vias de NF-κB, JNK e p38 são ativadas, resultando em sobrevivência celular.



FONTE: Modificada de BRENNER, BLASER, MAK, 2015.

Pelo exposto, a via de sinalização de TNF-α desencadeada pelos receptores TNFR1 e TNFR2 controla diversos e distintos processos biológicos, influenciando no destino celular. Assim, desregulação nesta via de modo a causar desequilíbrio entre os processos de sobrevivência e morte celular pode favorecer o processo tumorigênico. Embora diversos estudos tenham mostrado a influência de TNF-α e seus receptores em condições patológicas, a importância de cada receptor e sua influência na progressão da doença parece dependente do tipo de célula, estágio de desenvolvimento, presença de patógenos e microambiente. Em vista de sua

atividade pró ou antitumoral, terapias baseadas em inibidores de TNF-α e bloqueio dos receptores solúveis TNFR1 e TNFR2 tem sido propostas para o tratamento do câncer e doenças autoimunes e inflamatórias, apesar das limitações devido sua toxicidade sistêmica (BRENNER; BLASER; MAK, 2015; JOSEPHS et al., 2018, YANG et al., 2018a). Portanto, novas estratégias como as técnicas de silenciamento gênico (siRNA e shRNA) tem sido investigadas na terapia do câncer devido à alta eficiência, baixo custo comparado a outros métodos de terapia gênica e alta especificidade comparado a outros métodos de terapia de câncer como a quimioterapia, permitindo o desenvolvimento de drogas personalizadas (MANSOORI; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Recente estudo finalizado pelo nosso grupo de pesquisa (ROSSI et al., 2016) mostrou aumento na expressão gênica e proteica de TNF-α na mucosa gástrica de indivíduos com gastrite crônica *H. pylori* positivos com redução significante na expressão após erradicação deste patógeno. Em contraste, constatamos que a expressão dos miRNAs miR-103a, miR-181c, miR-370 e miR-375 estava reduzida na presença da *H. pylori* e que houve aumento significante após a terapia de erradicação. Também mostramos que a expressão de *TNFA* estava inversamente relacionada com a expressão destes miRNAs, sugerindo que esta citocina é modulada por miRNAs, podendo participar do processo patológico desencadeado pela *H. pylori* na mucosa gástrica. Estes resultados nos levaram a avaliar a influência da via de sinalização desencadeada por esta citocina em câncer gástrico e se miRNAs podem atuar sobre esta via por meio da desregulação na expressão de genes alvos. Além do mais, considerando a função dos receptores TNFR1 e TNFR2 nas respostas celulares desencadeadas por esta citocina e, considerando que os estudos abordando o papel destes receptores nesta neoplasia são limitados e inconclusivos, propusemos avaliar o efeito do seu silenciamento gênico e as consequências na expressão de genes *downstream* da via de sinalização de TNF-α em linhagem de câncer gástrico.

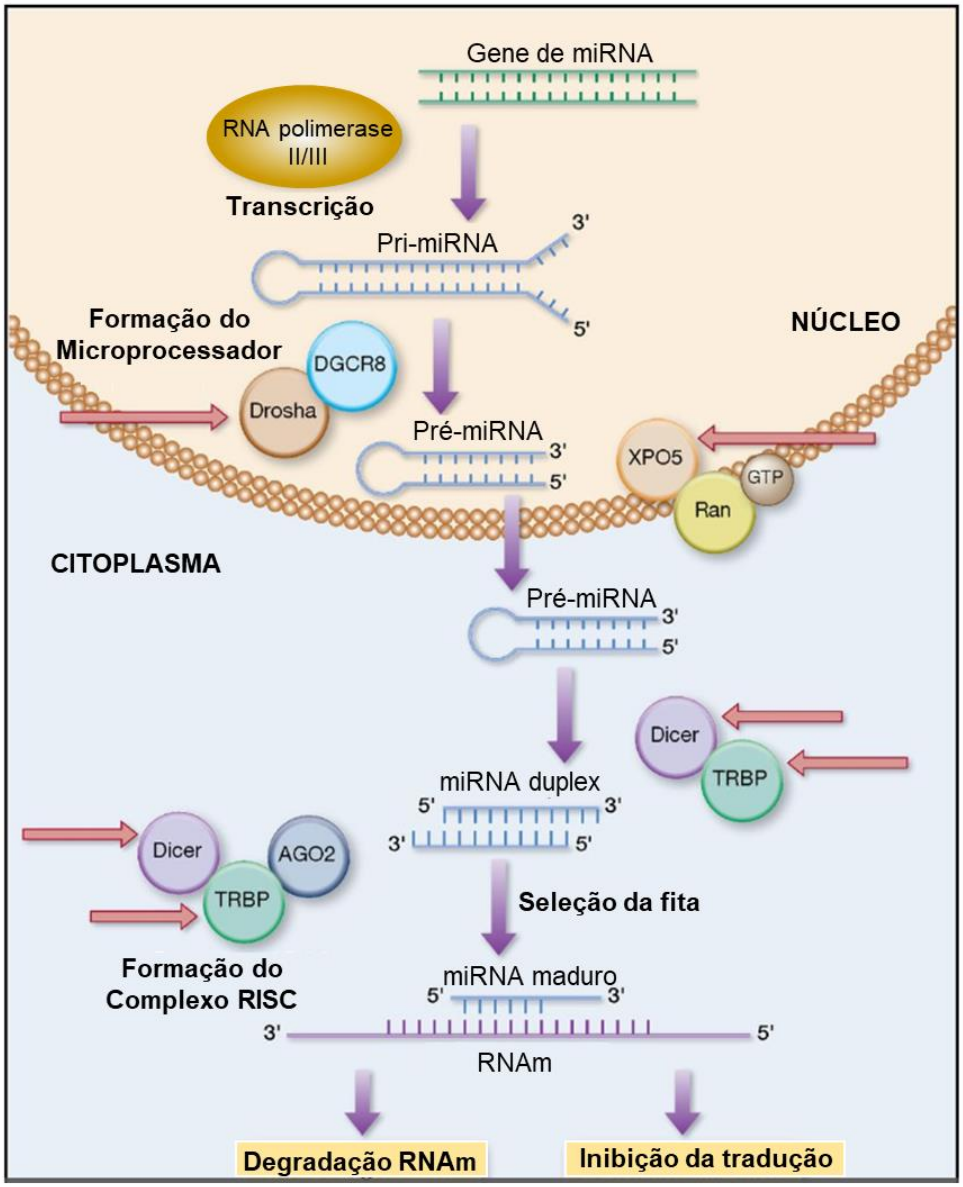
1.4 MicroRNAs: inflamação e câncer

Como destacado, inflamação crônica e infecção pela *H. pylori* podem induzir alterações epigenéticas na mucosa gástrica, dentre as quais destaca-se desregulação na expressão de miRNAs (CADAMURO et al., 2014; MURATA, 2018).

miRNAs são pequenos RNAs não codificantes que possuem cerca de 22 nucleotídeos e são encontrados em todas as células eucarióticas, regulando quase todas as vias biológicas (ACUNZO et al., 2015). Estes pequenos RNAs são transcritos principalmente pela RNA polimerase II a partir de genes evolutivamente conservados sendo localizados em introns, éxons de genes codificantes de proteínas ou em regiões intergênicas (de RIE et al., 2017). A biogênese de miRNAs é classificada em vias canônica (**Figura 5**) e não-canônica (O'BRIEN et al., 2018). A via canônica é dominante e nesta, após transcrição, o transcrito primário obtido denominado pri-miRNA (LEE et al., 2004) é processado por um complexo nuclear denominado microprocessador composto pela enzima RNase III Drosha e a proteína de ligação de RNA fita dupla DGCR8, produzindo um transcrito precursor (pré-miRNA) (TREIBER; TREIBER; MEISTER, 2019) que dobra-se por pareamento intramolecular de bases adquirindo uma estrutura em grampo (*hairpin*) (LEE et al., 2003; LI; PAN; LIN, 2006). Uma vez gerado, o pré-miRNA é exportado para o citoplasma pelo complexo Exportina-5/Ran-GTP, onde é clivado pela RNase III Dicer, originando um duplex de miRNA maduro com aproximadamente 22 nucleotídeos (YI et al., 2003; OKADA et al., 2009; RODEN et al., 2017). Nesta etapa, o miRNA fita dupla liga-se ao Complexo Silenciador induzido por RNA (RISC), composto pelas proteínas TRBP (*transactivation-responsive RNa-binding protein*) e Argonauta-2 (Ago2), que retém uma fita madura enquanto a fita complementar pode ser removida e degradada (CHENDRIMADA et al., 2005; DIEDERICHS; HABER, 2007; KOBAYASHI; TOMARI, 2016). Por outro lado, a biogênese não-canônica pode ser independente de Drosha/DGCR8 ou de Dicer. Exemplos de pré-miRNAs produzidos por via independente de Drosha/DGCR8 são os mirtrons, produzidos a partir de introns de RNA mensageiro (RNAm) durante o splicing (BARBIARZ et al., 2008), e pré-miRNAs com adição de 7-metilguanosina na extremidade 5' (XIE et al., 2013), os quais são exportados diretamente para o citoplasma através da Exportina-1 (O'BRIEN et al., 2018). Por outro lado, alguns miRNAs são processados pela Drosha, mas não apresentam comprimento suficiente para ser substrato da Dicer, requerendo Ago2 para completar sua maturação (YANG et al., 2010). O precursor do miR-451, específico de eritrócito, é um exemplo de miRNA curto para ser processado pela Dicer, ligando-se diretamente a Ago2 (TREIBER; TREIBER; MEISTER, 2019).

O silenciamento gênico pós-transcricional resulta da degradação do RNAm alvo ou repressão da tradução. Isto deve-se a complementaridade entre sequências do RNAm alvo, denominadas elementos de resposta de miRNAs (JO et al., 2015), e região *seed* do miRNA que corresponde aos nove primeiros nucleotídeos da extremidade 5' (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005; GU et al., 2009). Quando existe complementaridade completa entre estas sequências, o RNAm é degradado (ELBASHIR et al., 2001a, 2001b). Por outro lado, quando a complementariedade é parcial, o miRNA causa repressão da tradução, sendo este mecanismo o predominante em animais (BEILHARZ et al., 2009; O'BRIEN et al., 2018). A maioria dos dados mostram que miRNAs ligam-se a sequências específicas da região 3' não-traduzida (3'-UTR) de seus RNAm alvos, embora outros sítios de ligação foram detectados, incluindo a região 5'-UTR, sequência codificante e regiões promotoras. Com exceção da região promotora que induz a transcrição, a interação de miRNAs com as regiões 3'-UTR, 5'-UTR e sequência codificante resulta em silenciamento da expressão gênica (O'BRIEN et al., 2018). Assim, estima-se que aproximadamente 60% de todos os genes codificantes de proteínas sejam regulados por este mecanismo epigenético (BARTEL, 2009), sendo que foram encontrados 2654 miRNAs maduros em humanos (miRBASE, 2018).

Figura 5 - Representação esquemática da via canônica da biogênese de miRNAs e atividade do complexo RISC. miRNA: microRNA; RNAm: RNA mensageiro.



FONTE: Modificada de MULRANE et al., 2013.

Recentes estudos apontam que o perfil de miRNAs pode distinguir entre tecido normal e tumoral, identificar a origem de tecidos e discriminar entre diferentes subtipos do mesmo tipo de câncer, além de indicar resistência a terapia (IORIO; CROCE, 2012; ACUNZO et al., 2015). Além disto, trabalhos apontaram a presença de miRNAs circulantes no sangue, os quais são estáveis em diferentes condições de pH e temperatura, possibilitando sua utilização como biomarcadores de origem tumoral (ACUNZO et al., 2015) uma vez que sua expressão é tecido específica (LU et al., 2005). Em 2013, Pentheroudakis e colaboradores mostraram que um ensaio

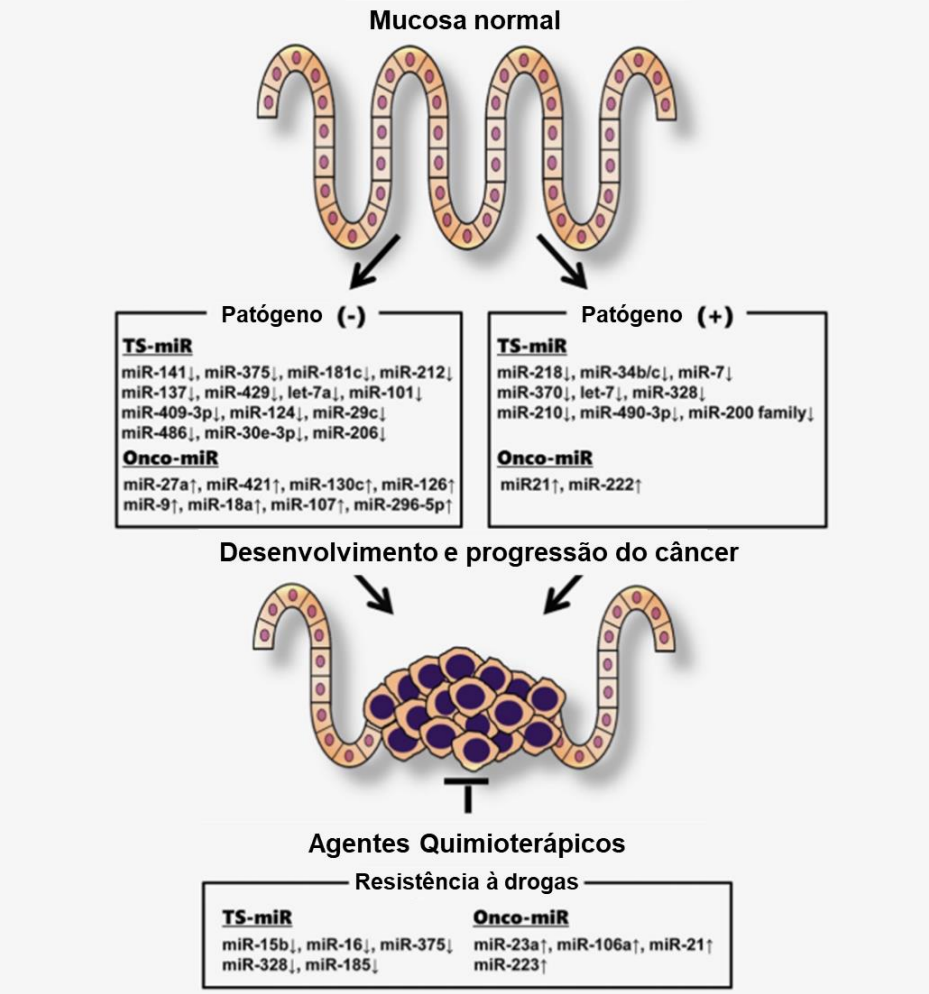
baseado na expressão de 64 miRNAs é capaz de indicar a origem tumoral com precisão de 92% (PENTHEROUDAKIS et al., 2013). Além da utilização como biomarcadores, padrão de expressão de miRNAs tem importância como indicador prognóstico de câncer, destacando neste contexto os miRNAs miR-21 (aumentado em vários tipos de câncer, como mama, glioblastoma, hepatocelular, pulmão e colorretal) e let-7 (diminuído em vários tipos de câncer, como próstata, pulmão, melanoma, mama - BOYERINAS et al., 2010) como os mais comumente associados com o resultado da doença (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014). Estudos também apontam a utilização de miRNAs como preditivos da eficácia de drogas e como potenciais agentes terapêuticos em câncer, podendo ser utilizado diretamente nas células tumorais ou como coadjuvante em associação com outras terapias. Embora os estudos de terapia baseada em miRNAs estejam ainda em fase inicial, alguns ensaios clínicos estão em andamento como, por exemplo, o MRX34 que é um mimético de miR-34a com resultados satisfatórios em câncer de fígado e pulmão (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014).

Diversos miRNAs tem sido associados com a regulação do processo inflamatório devido a infecção pela *H. pylori* (MATSUSHIMA et al., 2011; ROSSI et al., 2016), como também com lesões gástricas pré-cancerosas e o câncer gástrico (CADAMURO et al., 2014, ALESSANDRINI et al., 2018). Recentemente observamos que aumento na expressão dos miRNAs miR-103a, miR-181c, miR-370 e miR-375 em gastrite crônica após erradicação da bactéria *H. pylori,* o que foi associado com redução na expressão das citocinas IL-6 e TNF-α, sugerindo que os miRNAs podem influenciar a resposta inflamatória do hospedeiro contra a infecção (ROSSI et al., 2016). Expressão reduzida dos miRNAs da família do miR-200, além de miR-103 e miR-375, também foi correlacionada com aumento no infiltrado de neutrófilos e células mononucleares e com o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias em amostras de gastrite *H. pylori*- positivas (ISOMOTO et al., 2012). Por outro lado, esta bactéria foi relacionada ao aumento na expressão de miR-21 e miR-223 tanto em gastrite quanto em câncer gástrico (MATSUSHIMA et al., 2011; ZHANG et al., 2008; YANG et al., 2018b).

Os miRNAs podem atuar como oncogenes ou genes supressores de tumor em câncer, incluindo CG (POLAKOVICOVA et al., 2018). Wu e colaboradores (2011) avaliaram a expressão de 60 miRNAs em tecido de câncer gástrico e em mucosa normal adjacente e encontraram possível envolvimento de 38 destes miRNAs com o

processo de carcinogênese gástrica, sendo que miR-221, miR-15b, miR-181b, miR-199a-3p e miR-155 apresentaram maior expressão. Em revisão de Song e Meltzer (2012) foi proposto o aumento na expressão de 21 miRNAs (como miR-10a, miR-103a, miR-135b) e redução na expressão de miR-29c, miR-30a-5p, miR-148a, miR-375 e miR-638, como um perfil de expressão comum em câncer gástrico (SONG; MELTZER, 2012). Em 2016, Ishimoto e colaboradores destacaram distintos subconjuntos de miRNAs supressores de tumor e oncogênicos relacionados a carcinogênese gástrica associada ou não a infecção pela *H. pylori* (**Figura 6**). miR-19a possui papel oncogênico em câncer gástrico e redução na sua expressão suprime a proliferação, migração e invasão das células tumorais (ZHU et al., 2019). Por outro lado, expressão reduzida de miR-34a foi relacionada com metástase de linfonodo, menor taxa de sobrevivência e maior recorrência apontando para o papel supressor de tumor deste miRNA (YANG et al., 2016; ZHOU et al., 2018; ZHANG et al., 2015). Entretanto, para muitos miRNAs, como miR-103a, miR-130a e miR-181c, os estudos são controversos e a definição como pró ou antitumoral é ainda inconclusiva (CUI et al., 2013; LIANG et al., 2015; ZHOU et al., 2017; HU et al., 2018; WANG et al., 2018a; ZABAGLIA et al., 2018).

Figura 6 - miRNAs envolvidos na carcinogênese gástrica e terapia. A carcinogênese gástrica pode ser dividida em dois grupos de acordo com a infecção por patógeno. Distintos subconjuntos de miRNAs são implicados em cada processo carcinogênico. A resposta a agentes quimioterápicos é também regulada por outro subconjunto de miRNAs.



FONTE: Modificada de ISHIMOTO et al., 2014.

Devido a relação dos miRNAs miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a e miR-181c com o câncer gástrico, infecção pela *H. pylori* e inflamação, estes miRNAs foram selecionados para análise de expressão no presente estudo (**Tabela 1**). Além disto, pesquisa em bancos de dados públicos (TarBase, miRWalk, miRTarbase, miRDB, microRNA.org, PITA 0 0 ALL, TargetScan, RNA-22, miRmap) indicam que estes miRNAs apresentam TNF-α e/ou genes da sua via de sinalização como alvos preditos ou validados, de modo que sua ação na tumorigênese gástrica e inflamação pode ser resultante da alteração na expressão destes genes e consequente desregulação desta via de sinalização.

Tabela 1: miRNAs com atuação na carcinogênese gástrica e via de sinalização de TNF-α.

miRNA (ID-miRBase[1])	**Localização**	**Alvos Preditos[2] ou validados***	**Associações**	**Referências**
hsa-miR-19a-3p (MIMAT0000073)	13q31	*TNFA, TNFR1, TNFR2* CASP8[2]*	- Oncomir - Influencia a apoptose - Expressão aumentada associada com proliferação, migração e invasão em CG	Zhao et al., 2017 Zhu et al., 2019
hsa-miR-34a-3p (MIMAT0004557)	1p	*TNFA**	- Supressor tumoral - Expressão aumentada suprime a proliferação celular e induz apoptose	Deng et al., 2018 Wang et al., 2018b
hsa-miR-103a-3p (MIMAT0000101)	5q34	*TNFR2, CFLIP* TNFA, CASP3, TRADD[2]*	- Oncomir ou supressor tumoral - Expressão aumentada associada a aumento da proliferação em CG - Expressão reduzida acelera a proliferação, migração e invasão em células de CG	Hu et al., 2018 Liang et al., 2015
hsa-miR-130a-3p (MIMAT0000425)	11q12	*TNFA, TNFR2* CFLIP[2]*	- Oncomir ou supressor tumoral - Expressão reduzida em CG associada com menor sobrevivência -Expressão aumentada facilita a invasão e migração em células de CG	Wang et al., 2018a Zhou et al., 2017
hsa-miR-181c-5p (MIMAT0000258)	19p13	*TNFA[2]*	- Oncomir ou supressor tumoral - Expressão reduzida em CG - Aumento de expressão resulta em redução do crescimento e repressão de oncogenes - Expressão reduzida associada com maior taxa de sobrevivência	Zabaglia et al, 2018 Hashimoto et al., 2010 Cui et al., 2013

[1] miRBase: http://www.mirbase.org

[2/*] TarBase (VLACHOS et al., 2009), miRWalk (DWEEP; GRETZ, 2015), miRTarbase (CHOU et al., 2016), miRDB (WONG; WANG, 2015; WANG, 2016), microRNA.org (BETEL et al., 2008), PITA 0 0 ALL (HENRY et al., 2014), TargetScan (AGARWAL et al., 2015), RNA-22 (MIRANDA et al., 2006), miRmap (VEJNAR; BLUM; ZDOBNOV, 2013)

2 OBJETIVOS

Geral

Avaliar a expressão de genes e miRNAs relacionados a via de sinalização de TNF-α, além de influencia da infecção pela *H. pylori,* em amostras de câncer gástrico. Também investigar, em linhagem celular de câncer gástrico, o efeito do silenciamento dos receptores TNFR1 e TNFR2 sobre a expressão de mediadores e miRNAs envolvidos com esta via e em processos celulares como proliferação e apoptose, assim como os efeitos do tratamento com extrato da *H. pylori.*

Específicos

a - Avaliar a expressão quantitativa do RNAm de mediadores e receptores da via de sinalização de TNF-α (*TNFA, TNFR1, TNFR2, TRADD, TRAF2, CFLAR/CFLIP, CASP3*, *CASP8, NFKB1* e *NFKB1*) e de miRNAs que alvejam genes desta via (hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-34a-3p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-181c-5p), assim como suas relações em amostras de câncer gástrico com e sem infecção pela *H. pylori.*

b - Construir uma rede de interação miRNAs-RNAm.

c - Avaliar o efeito do silenciamento dos receptores TNFR1 e TNFR2 e do tratamento com extrato da *H. pylori* (eHP) em linhagem de câncer gástrico na expressão de genes e miRNAs da via de sinalização de TNF-α, bem como nos processos celulares de proliferação, ciclo celular e apoptose.

3 CAPÍTULO I

Manuscrito publicado na revista *World Journal of Gastroenterology Oncology*
ISSN 1948-5204
Fator de impacto: 2,758

Name of Journal: *World Journal of Gastrointestinal Oncology*

Number ID: 45616

Manuscript Type: BASIC STUDY

Up-regulation of TNF-α pathway survival genes and of the receptor TNFR2 in gastric cancer

Running title: Up-regulation of TNF-α pathway in gastric cancer.

Authors: Ana Flávia Teixeira Rossi, Júlia Cocenzo Contiero, Fernanda da Silva Manoel-Caetano, Fábio Eduardo Severino, Ana Elizabete Silva

Ana Flávia Teixeira Rossi, Júlia Cocenzo Contiero, Fernanda da Silva Manoel-Caetano, Ana Elizabete Silva**,** Department of Biology, São Paulo State University – UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto – SP, 15054-000, Brazil

Fábio Eduardo Severino**,** Department of Surgery and Orthopedics, Faculty of Medicine, São Paulo State University – UNESP, Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, Botucatu- SP, 18618-687, Brazil

ORCID number: Ana Flávia Teixeira Rossi (0000-0002-3476-2885), Júlia Cocenzo Contiero (0000-0002-3944-2717), Fernanda da Silva Manoel-Caetano (0000-0001-6717-5874), Fábio Eduardo Severino (0000-0002-2304-3404), Ana Elizabete Silva (0000-0003-1491-8878).

Author Contributions: AFTR and AES outlined the study. AFTR, JCC, FSMC performed the experiments. AFTR analyzed and interpreted the results. FES built the interaction network. AFTR and AES drafted the manuscript and revised it. All authors approved the final version of the manuscript.

Supported by São Paulo Research Foundation [FAPESP, grants number 2015/21464-0 and 2015/23392-7] and National Counsel of Technological and Scientific Development – CNPq [grant number 310120/2015-2].

Institutional review board statement: This study was approved by local Research Ethics Committee (CEP – IBILCE/UNESP, number 1.336.892).

Institutional animal care and use committee statement: not applicable.

Conflict-of-interest statement: The authors declare that they have no conflict of interest.

Data sharing statement: participants gave written informed consent for data sharing

ARRIVE guidelines statement: have been adopted

Correspondence to: Ana Elizabete Silva, PhD, Department of Biology, São Paulo State University – UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto – SP, 15054-000, Brazil, e-mail: ae.silva@ unesp.br
Telephone: +55 17 3221-2384
Fax: +55 17 32221-2390

ABSTRACT

BACKGROUND

Gastric carcinogenesis can be induced by chronic inflammation triggered by *Helicobacter pylo*ri (*H. pylori*) infection. Tumor necrosis factor (TNF)-α and its receptors (TNFR1 and TNFR2) regulate important cellular processes, such as apoptosis and cell survival, and the disruption of which can lead to cancer. This signaling pathway is also modulated by microRNAs (miRNAs), altering gene expression.

AIM

To evaluate the mRNA and miRNAs expression involved in the TNF-α signaling pathway in gastric cancer tissues and its relationship.

METHODS

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) by TaqMan® assay was used to quantify the RNA transcript levels of TNF-α signaling pathway (*TNF, TNFR1, TNFR2, TRADD, TRAF2, CFLIP, NFKB1*, *NFKB2, CASP8, CASP3)* and miRNAs that targets genes from this pathway (miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a, miR-181c) in 30 gastric cancer (GC) fresh tissue samples. Molecular diagnosis of *H. pylori* was performed by nested PCR for gene *HSP60*. A miRNA:mRNA interaction network was construct using Cytoscape v3.1.1 from the *in silico* analysis performed using public databases.

RESULTS

Up-regulation of cellular survival genes as *TNF, TNFR2, TRADD, TRAF2*, *CFLIP*, and *NFKB2,* besides *CASP8* and miR-34a was observed in GC tissues, whereas mediators of apoptosis such as *TNFR1* and *CASP3* were down-regulated. When the samples were stratified by histological type, the expression of miR-103a and miR-130a was significantly increased in the diffuse-type of GC compared to the intestinal-type. However, no influence of *H. pylori* infection was observed on the expression levels of mRNA and miRNAs analyzed. Moreover, the miRNA:mRNA interaction network showed several interrelations between the miRNAs and their target genes, highlighting miR-19a and miR-103a, which has as predicted or validated target a

large number of genes in the TNF-α pathway, including *TNF, TNFR1, TNFR2, CFLIP, TRADD, CASP3* and *CASP8.*

CONCLUSION

Our findings show that cell survival genes mediated by TNF/TNFR2 binding is up-regulated in gastric cancer favoring its pro-tumoral effect, while pro-apoptotic genes as CASP3 and TNFR1 are down-regulated, indicating disbalance between apoptosis and cell proliferation processes in this neoplasm. This process can also be influenced by an intricate regulatory network of miRNA:mRNA.

Key words: gastric cancer, TNF-α signaling, TNFR1, TNFR2, cellular survival, miRNAs

Core tip: We evaluated the expression of mRNA and miRNAs related to the TNF-α signaling pathway in gastric cancer (GC) fresh tissues. Our study shows up-regulation of cell survival genes (*TNF, TNFR2, TRADD, TRAF2*, *CFLIP*, *NFKB2, CASP8)* of this signaling pathway in GC, stimulating cell growth possibly by TNFR2 and negatively controls TNFR1-mediated apoptosis by down-regulation of pro-apoptotic mediators (*TNFR1* and *CASP3)*. Furthermore, interaction network between miRNAs and mRNA investigated suggests that TNF-α signaling pathway can be regulated by the action of miRNAs, mainly miR-19a and miR-103a, which may influence tumor development. Ours findings suggest TNFR2 as a potential therapeutic target for GC.

Rossi AFT, Contiero JC, Manoel-Caetano FS, Severino FE, Silva AE. **Up-regulation of TNF-α pathway survival genes and of the receptor TNFR2 in gastric cancer**

INTRODUCTION

As the sixth most common cancer and the fifth leading cause of cancer-related death worldwide, gastric cancer (GC) is currently one of the most relevant neoplasms [1,2]. Despite the geographical variabilities, it has a high incidence especially in Asia and Eastern Europe, and also in developing countries of South America [3]. In Brazil, it is estimated 13540 new cases of this cancer in men and 7750 in women in the year 2019, occupying the fourth in incidence among men and the sixth among women [4]. Intestinal-type adenocarcinoma is the most common type of GC and is the result of a multi-step process that begins with chronic gastritis and can progress to atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and cancer [5]. This process can originate from chronic inflammation, mainly as a consequence of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection [6]. This Gram-negative bacterium promotes oxidative stress that induces DNA damage and triggers a repair response by stimulating growth and survival factors as well as regulatory cytokines that can initiate the carcinogenic process [7].

Tumor necrosis factor (TNF)-α is a pleiotropic cytokine important to ensure tissue homeostasis [8,9]. Deregulation of the TNF-α signaling can affect cellular responses, causing inflammatory diseases and cancer [10]. It is one of the main pro-inflammatory mediators produced during the inflammatory response [11], causes diverse cellular responses such as apoptosis, cell survival, angiogenesis, and metastasis [11,12]. In cancer, TNF-α can have both pro- and anti-tumoral effects based on interaction with its receptors TNFR1 and TNFR2 [13]. Only TNFR1 possesses an intracellular death domain and thus can induce both apoptotic signaling and transcription of cell survival genes [14]. Although its role is less well understood, TNFR2 activation largely results in NF-κB stimulation and cell proliferation [15].

In gastric tissues, increased expression of TNF-α has been observed in the normal mucosa as well as in chronic gastritis, intestinal metaplasia and dysplasia [16], active chronic gastritis [17] and GC [18], this factor plays an important role in progression of the lesion cascade that leads to GC.

Recently, we reported up-regulation of TNF-α mRNA and protein and other inflammatory mediators in chronic gastritis associated with *H. pylori*; we also observed deregulation of miRNAs that interact with genes encoding cytokines. Interestingly, after bacterial eradication treatment, expression of *TNF* mRNA was reduced and that of several miRNAs, such as miR-103a and miR-181c, was

increased [19]. Considering that TNF-α regulates cellular processes as apoptosis and cell survival according to binding to its TNFR1 and TNFR2 receptors, we used GC fresh tissue samples to investigate the mRNA expression of these receptors and important downstream genes involved in TNF-α signaling pathway [*TNF, TNFR1* (*TNFRSF1A*)*, TNFR2* (*TNFRSF1B*)*, TRADD, TRAF2, CFLIP* (*CFLAR*)*, NFKB1, NFKB2, CASP8* and *CASP3*], and potentially related miRNAs (miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a and miR-181c) chosen from public database search [20-29]. In addition, we evaluated the relationship between miRNA and mRNA via construction of an interaction network. We observe that TNF-α signaling is deregulated in GC through up-regulation of *TNFR2* and downstream survival genes, which may favor the cell survival, and conversely, down-regulation of TNFR1 and *CASP3* involved in apoptosis evasion.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Samples

This study was approved by local Research Ethics Committee (CEP – IBILCE/UNESP, number 1.336.892), and written informed consent was obtained from all individuals in previous studies [30,31].

A total of 30 fresh tissues samples of gastric adenocarcinoma were collected from gastric biopsies or surgical resection of the 30 patients attended at the Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brazil, without previous chemotherapy and radiotherapy, as previously described [30,31]. The samples were diagnosed according Lauren classification as diffuse and intestinal- type [32]. In addition, four fresh tissue samples were collected from gastric biopsies from individuals with histologically normal gastric mucosa (*H. pylori*-negative). These normal tissue samples were used as a pool for calibration in the reverse transcription (RT)-qPCR analysis. The demographic and clinical pathological data are presented in Table 1. For this study, total DNA and RNA stored and extracted using TRIzol® reagent (Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, United States) in previous works were used [30,31].

Molecular diagnosis of *H. pylori* infection

Molecular diagnosis of *H. pylori* was performed by nested PCR in DNA samples to evaluate the presence of the *HSP60* gene according to the protocol described by Singh et al. (2008) [33]. A 501-bp fragment was only observed in *H. pylori*-positive

samples. Negative controls, without DNA and with *H. pylori*-negative DNA, were used in all reactions.

Quantification of mRNA and miRNA expression by RT-qPCR

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from mRNA and miRNA using a High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, California, USA) and TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, California, USA), respectively, according to the manufacturer's protocol.

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using a *StepOnePlus Real Time PCR System 2.2.3 (*Applied Biosystems, California, USA) with TaqMan® for target genes *TNF* (Hs01113624_g1)*, TNFR1 (TNFRSF1A) (*Hs01042313_m1)*, TNFR2 (TNFRSF1B) (*Hs00961749_m1)*, TRADD* (Hs00182558_m1)*, TRAF2* (Hs00184192_m1)*, CFLIP (CFLAR)* (Hs00153439_m1)*, NFKB1* (Hs 00765730_m1), *NFKB2* (Hs01028901_g1), *CASP8* (Hs01116281_m1) and *CASP3* (Hs00234387_m1), and for target miRNAs hsa-miR-19a-3p (MIMAT0000073; ID 000395), hsa-miR-34a-3p (MIMAT0004557; ID 002316), hsa-miR-103a-3p (MIMAT0000101; ID 000439), hsa-miR-130a-3p (MIMAT0000425; ID 000454) and hsa-miR-181c-5p (MIMAT0000258; ID 000482) *(*Applied Biosystems, California, USA*)*. All reactions were performed in triplicate with a final volume of 10 µL using GoTaq® Probe qPCR Master Mix 2X (Promega, Wisconsin, USA). Relative quantification (RQ) of mRNA and miRNA expression was calculated by the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method [34] using a pool of normal mucosa samples as a calibrator. Reference genes *ACTB* (Catalog#: 4352935E) and *GAPDH* (Catalog#: 4352934E) and endogenous RNU6B (ID 001093) and RNU48 (ID 001006) were adopted for normalization of mRNA and miRNA quantification, respectively, as validated in our previous studies [17,28]. qPCR experiments followed MIQE guidelines [35], and RQ values are expressed as the median of gene and miRNA expression for GC in relation to that of the normal mucosa pool.

***In silico* analysis for prediction of miRNA targets and the miRNA-mRNA interaction network**

In silico analysis was performed using public databases for predicted and validated target genes of the five miRNAs evaluated. The databases used were as follows: TarBarse [20], miRWalk 2.0 [21], miRTarbase [22], miRDB (MirTar2 v4.0) [23,24],

microRNA.org [25], PITA 0 0 ALL [26], TargetScan [27], RNA-22 [28] and miRmap [29]. Only target genes predicted by at least three databases were considered.

Data were integrated using bioinformatic methods, and protein annotations were then used to construct protein:protein interaction networks (PPI). The PPI networks were generated using Metasearch *STRING* platform v10.5 [36]. Data visualization and integration between PPI and miRNA:target gene networks were performed using *Cytoscape* v3.1.1 [37].

Statistical analysis

The D'Agostino and Pearson normality test was used to evaluate the distribution of the data, which did not present normal distribution, therefore non-parametric tests were used. Alterations in expression of genes or miRNAs in the GC group in relation to a pool of normal mucosa were evaluated by the Wilcoxon Signed Rank test [38]. The Mann-Whitney test was employed to investigate associations of *H. pylori* infection, adenocarcinoma histological type, gender and age with mRNA and miRNA expression in GC group. Correlation analysis between mRNA expression and between miRNA/mRNA expression was performed by Spearman's correlation. Values of $p<0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Molecular diagnosis for *H. pylori*

Among the 30 GC samples diagnosed for *H. pylori* infection, 50% (15) were positive for the presence of this bacterium. All four samples of normal gastric mucosa had the diagnosis confirmed as *H. pylori* -negative (Table 1).

Expression of TNF-α pathway genes

GC samples showed significantly up-regulated mRNA expression of *TNF* (RQ=3.78, $p<0.001$), *TNFR2* (RQ=1.98, $p<0.001$), *TRADD* (RQ=2.14, $p=0.004$), *TRAF2* (RQ=3.70, $p<0.001$), *CFLIP* (RQ=2.03, $p<0.001$), *NFKB2* (RQ=2.16, $p<0.001$), and *CASP8* (RQ=2.58, $p<0.001$) in comparison with normal mucosa, whereas *TNFR1* (RQ=0.66, $p=0.037$) and *CASP3* (RQ=0.29, $p<0.0001$) were down-regulated (Figure 1). No any significant change in *NFKB1* mRNA expression was found in GC samples.

Correlation analysis between the mRNA expression of genes involved in the TNF-α pathway showed an intricate network of positive correlations in GC (Table 2). *TNFA* correlated with expression of all other genes, with exception of *TNFR1,* while this showed a strong correlation only with *TNFR2*. Conversely, *TNFR2* correlated positively with expression of all other genes. The strongest correlation was observed between *CFLIP* and *CASP8* (r=0.91; p<0.001) (Table 2).

Expression of miRNAs related to TNF-α pathway

In general, expression of miRNAs (miR-19a, miR-103a, miR-130a and miR-181c) were not deregulated in GC (Figure 2), an exception is the significant up-regulation of miR-34a (RQ=1.39, p=0.017).

No association between miRNA expression was found for gender, age or *H. pylori* infection in GC samples. However, association analysis showed that expression of miR-103a (p=0.035) and miR-130a (p=0.011) was significantly increased in the diffuse-type of GC (RQ=1.53 and 4.83, respectively) compared to the intestinal-type (RQ=0.55 and 0.52, respectively). In addition, expression of miR-103a was down-regulated when comparing only the intestinal- type of GC samples with normal mucosa (RQ=0.55, p=0.037) (Figure 3). When we evaluated the influence of these factors on mRNA expression of TNF-α pathway genes, no association was found.

miRNA–mRNA correlation and interaction networks

A miRNA:mRNA interaction network integrating miRNAs with the proteins encoded by genes of the TNF-α pathway was constructed based on *in silico* analysis using public databases (Figure 4). The obtained protein-protein interaction (PPI) network reinforced the significant correlation gene:gene found between the genes of the TNF-α pathway in GC (Table 2) samples. We also performed a correlation analysis between the transcripts levels of miRNAs:mRNA of TNF-α pathway in GC samples, but no negative correlation was observed (data not shown). However, the miRNA:mRNA interaction network shows several possible relationships between mRNA and miRNAs evaluated.

This interaction network generated in this study suggest that all evaluated miRNAs can act on the TNF-α pathway to influence cellular responses with *TNF* as a predicted or validated target. Furthermore, it highlights miR-19a and miR-103a, which

can regulate the greatest number of genes, including *TNF, TNFR1, TNFR2, CFLIP, TRADD, CASP3* and *CASP8*.

DISCUSSION

This is the first study to investigate the expression of genes that participate in the TNF-α pathway and its relationship to miRNA expression in gastric cancer. Our results show that this pathway is deregulated in GC may promote cell survival through TNF-α/TNFR2/NF-κB and to prevent apoptosis. We observed up-regulation of *TNF, TNFR2* receptor*,* downstream cell survival genes as *TRAF2*, *TRADD, CFLIP* and *NFKB2,* beyond *CASP8* and miR-34a, and down-regulation of *TNFR1* and *CASP3*, indicating predominant expression of anti-apoptotic in relation to pro-apoptotic mediators in GC tissues. In addition, the miRNA:mRNA interaction network generated indicates that miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a and miR-181c may target genes of the TNF-α signaling, such as *TNFA, TNFR1* and *TNFR2.*

TNF-α pathway genes and their receptors may have opposite effects on tumorigenesis depending on the developmental stage and tumor type [11]. In GC, the present study showed increased expression of *TNFA* so that this cytokine has a promoting effect that is necessary even when such interleukins as IL-1β and IL-6 are present in the tumor tissue [8]. Considering the role of TNFA receptors, Oshima et al showed that TNFR1-mediated stimulation of TNF-α signaling in bone marrow-derived cells from knockout mice induces tumor-promoting factors, as *Noxo1* and *Gna14,* in tumor cells [8]. In contrast, anti-tumor effects of this receptor were observed in $CD4^+$ T cells isolated from mice, as the absence of TNFR1 signaling promoted angiogenesis and carcinogenesis [39]. Regarding TNFR2, induction of its expression in a colorectal cancer cell line results in a significant increase in cellular proliferation, promoting tumor growth via the PI3K/AKT pathway [40]. Similar to the results of the present study, Al-Lamki et al found a significant increase in TNFR2, but not in TNFR1, in clear cell renal carcinoma and reported that this increase was correlated with a high degree of malignancy and activation of NF-κB and VEGFR2, causing cell cycle entry [41]. Furthermore, blocking TNFR2 by short hairpin RNA (shRNA) in Lewis lung carcinoma cell culture leads to increased TNF-mediated apoptosis and decreased angiogenesis, which may result in tumor regression [42]. Therefore, TNFR2 is possibly

the major receptor related to tumor progression triggered by the TNF-α pathway in GC.

In the cell proliferation pathway (Figure 5), after binding of TNF-α to TNFR2, TRAF2 associates with the intracellular portion of the receptor. As the key mediator of this signaling pathway, TRAF2 promotes the binding of anti-apoptotic proteins (cIAP1 and cIAP2) to TNFR2 [43-45]. This TNFR2/TRAF2 interaction evokes transcriptional activation of genes related to cell survival, such as NF-κB [15], which induces transcription of anti-apoptotic genes including cFLIP, TRAF1 and TRAF2 [46,47] to prevent cell death. In our study, we observed up-regulation of *TRAF2, NFKB2* and *CFLIP* mRNAs in GC. These findings are consistent with the positive correlations observed between *TNFR2* mRNA and anti-apoptotic genes (*CFLIP* and *TRAF2*) as well as activation of cell proliferation (*NFKB1* and *NFKB2*). All these results together corroborate the predominance of cell survival pathway gene expression mediated by TNF-α/TNFR2/NF-κB in GC.

However, *TNFR1* mRNA was down-regulated in GC samples, indicating that the apoptosis pathway may be impaired. This result is also consistent with increased expression of *TRADD*, *TRAF2* and *CFLIP* and decreased expression of *CASP3*. Interaction between TRAF2 and TNFR1, via the TRADD adapter protein [45], inhibits the ability of this receptor to induce apoptosis [49] by impairing formation of the death-inducing signaling complex (DISC), also called Complex II (Figure 5). When the apoptotic pathway is activated, TNFR1 and the adapter proteins TRADD, TRAF2 and RIP1 associated with it undergo conformational changes that result in TRADD dissociation from the receptor and release of the death domain. TRADD together with FADD and pro-caspase-8 form the DISC [50,51], which activate caspase-8 via proteolytic cleavage of its precursor, consequently resulting in activation of the caspase-3 effector and apoptosis [14]. In contrast, cFLIP, which is induced by NF-κB, inhibits the activity of the DISC due to its homology with caspase-8 [50]. cFLIP interacts directly with pro-caspase-8 to form a heterodimer that suppresses precursor cleavage and consequent activation of the caspase [52]. Therefore, when NF-κB is activated, cells are resistant to apoptosis triggered by TNFR1 through promotion of cFLIP expression and inhibition of pro-caspase-8 binding to FADD [50]. In the GC samples evaluated in this study, we found increased expression of *CASP8* mRNA, which may result from factors generated in inflammatory conditions such as nitric oxide [53] and interferon-Y [54] that are up-regulated in stomach cancer [55, 56].

However, the cFLIP-mediated apoptotic signaling blockade results in low expression of *CASP3* and consequent reduction of cell death.

Deregulation of global gene expression is a key characteristic during malignant progression, and miRNAs are important regulators of this process, including in GC [57]. Thus, we consulted public databases and selected miRNAs miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a and miR-181c, which target genes of the TNF-α pathway, as a change in their expression may impact regulation of this pathway. In general, the expression of miRNAs was not deregulated in GC, though the miR-34a was up-regulated.

Several studies highlight the tumor-suppressor role of miR-34a, whereby reduced expression is associated with an advanced clinical stage, lymph node metastasis [58], a lower survival rate [59], and a higher recurrence rate [60] in patients with gastric cancer. However, our results corroborate an oncogenic action of the miR-34a because a significant increase in its expression observed in GC [61] and association with a lower overall survival [62]. Nonetheless, as a recent meta-analysis did not find a significant association between expression of this miRNA and overall survival [63], further studies are needed to clarify the role of miR-34a in GC.

In our study, expression of the oncogenic miRNAs miR-19a, miR-103a and miR-130a was not deregulated in GC samples. When we stratified the samples by histological type, significantly higher expression of both miR-103a and miR-130a was detected in diffuse-type GC than in the intestinal-type. Furthermore, expression of miR-103a was down-regulated when considered only the intestinal type of GC in relation to normal mucosa. Although miR-103a has already been confirmed as a highly sensitive and specific biomarker of the diffuse type [64], the action of miR-130a in gastric carcinogenesis remains unsure. All these miRNAs may have both oncogene and tumor-suppressor roles in different stages of neoplastic development and tumor type. Up-regulation of these miRNAs has been associated with metastasis, proliferation and cell invasion in GC [65-67]. Conversely, some studies have shown decreased expression of miR-103a and miR-130a, correlating these findings with GC tumorigenesis, cell migration, invasion and metastasis [68,69].

Regarding miR-181-c, our results showed no alteration of miRNA expression in gastric cancer samples. However, in our previous study, we observed reduced expression of this miRNA in biopsies from chronic gastritis patients, but after bacterial eradication therapy, a significant increase of its expression was observed. Thus,

suggesting that the inflammatory process induced by *H. pylori* can regulate its expression [19]. Few studies have evaluated this miRNA in gastric cancer and the results are discordant. Recently, Zabaglia et al (2018) [70] observed lower expression of miR-181c in gastric cancer patients compared with control and chronic gastritisgroups. On the other hand, Cui et al. (2013) [71] correlated reduced expression of this miRNA with a higher survival rate of gastric cancer patients. Therefore, the role of this miRNA in the gastric carcinogenesis needs to be further investigated.

H. pylori infection is an important factor associated with gastric lesions, and GC may result in deregulation of expression of various genes and miRNAs that function in defense mechanisms, inflammatory and immune responses and cellular kinetics [19,72]. Although, in the present study, mRNA and miRNA expression were not influenced by *H. pylori* infection, in a previous study [19], we observed that *H. pylori* infection deregulates miRNA expression in chronic gastritis patients, suggesting that it may act differently at distinct stages of gastric tumorigenesis, most likely being more important in the early stages of carcinogenesis.

In addition, we analyzed correlations and the miRNA:mRNA interaction network involving miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a and miR-181c, which can regulate the TNF-α pathway. Although no negative correlation between miRNA and mRNA expression was observed in GC, we did identify an intricate network of relationships between TNF-α pathway genes and miRNAs, especially *TNF* and *TNFR2*, which are predicted or validated targets of some of these miRNAs in other types of cancer, highlight miR-19a and miR-103a. Therefore, both miRNAs are strong candidates for functional studies in gastric cancer cell line.

TNF-α is a validated target of miR-19a-3p [73], miR-34a-3p [74] and miR-130a-3p [75] in esophageal squamous cell carcinoma, macrophages and cervical cancer, respectively. Moreover, a negative feedback between *TNF* and miR-130a exists. In cervical cancer lines treated with TNF-α, an increase in the nuclear level of the p50 subunit of NF-κB occurs, which results in increased expression of miR-130a and consequently reduced expression of *TNF* [75]. TNF-α is also a predicted target of miR-103a-3p and miR-181c-5p (Figure 4) and is inversely correlated in *H. pylori*-positive chronic gastritis patients, both before and after eradication treatment [19]. Absence of a negative correlation between miRNA and mRNA expression in GC samples does not invalidate the relationship shown in our miRNA:mRNA interaction network

building from bioinformatics data, since the regulation of gene expression by miRNAs can be influenced by several factors, as infectious agents [19], DNA methylation [76] and probably by distinct stages of carcinogenesis.

As observed in our interaction network (Figure 4), TNF-α is not the only gene targeted by miRNAs. *TNFR2* can be regulated by miR-19a, miR-103a and miR-130a, whereas miR-19a also regulates *TNFR1*. Other downstream genes are also predicted targets of these miRNAs, including *TRADD*, *CFLIP*, *CASP8* and *CASP3*, highlighting that miR-19a and miR-103a target the largest number of genes of the TNF-α pathway. Therefore, deregulated expression of these miRNAs may influence several genes and disrupt cell processes such as survival and apoptosis.

CONCLUSIONS

Our study shows up-regulated expression of important genes of the TNF-α signaling pathway related to cell survival in gastric cancer mediated by TNFR2 receptor, and down-regulation of pro-apoptotic *CASP3* gene and the TNFR1 receptor. This predominant expression of anti-apoptotic in relation to pro-apoptotic mediators may favor cell survival and apoptosis evasion, highlighting the pro-tumor effect of TNF-α on gastric cancer. Furthermore, this signaling pathway can be regulated by the action of miRNAs, as shown by our interaction network, may influence the development and tumoral progression. However, further studies blocking TNFR2 should be conducted for negatively influence the expression of cell survival genes.

ARTICLE HIGHLIGHTS

Research background

TNF-α is a proinflammatory cytokine with opposite effects according activation of its TNFR1 and TNFR2 receptors, can provide signals for activation, differentiation, survival cell, invasion and propagation of cancer cells or induce apoptosis. This way, TNF-α signaling pathway perform several biological functions, as well as modulate the immune response and inflammation, so deregulation of this pathway has been implicated with inflammatory diseases and cancer. Therefore, studies are needed to better understand the relationships of this signaling network and the protumorigenic or antitumorigenic effects, as well as the tumor development and progression in different types of neoplasms.

Research motivation

We previously evaluated the effect of eradication therapy of *H. pylori* on expression levels of cytokines genes and the expression of miRNAs involved with regulation of inflammatory process. We observed up-regulation of TNF-α mRNA and protein and other inflammatory mediators in samples of chronic gastritis patients infected by *H. pylori.* Moreover, we also observed deregulation of miRNAs that interact with genes encoding cytokines. Interestingly, after bacterial eradication treatment, the expression levels of *TNF* mRNA were reduced and that of several miRNAs, such as miR-103a and miR-181c, were increased. Considering that TNF-α can have both pro- and anti-tumoral effects activating processes as apoptosis and cell survival depending on the interaction with its TNFR1 and TNFR2 receptors, we proposed the present study. Therefore, we decided to quantify the transcript levels of the TNF-α signaling pathway genes and of TNFR1 and TNFR2 receptors, as well as the involvement of miRNAs that may participate in the regulation of this signaling pathway, in fresh tissues of gastric cancer patients.

Research objectives

Considering that while the TNF-α/TNFR1 binding promotes the activation of the apoptosis cascade and the TNF-α/TNFR2 leads to activation of the cell survival pathway, the main objective of this study was to investigate which of the two receptors are most expressed in gastric cancer, and downstream genes of TNF-α signaling pathway, thus favoring the cell survival or apoptosis processes. A secondary objective was to evaluate the relationship between miRNA and mRNA via construction of an interaction network. The results may highlight important genes that regulate cell proliferation and possible molecular targets that act on gastric carcinogenesis.

Research methods

Sensitive and validated techniques were employed for RNA quantification of the genes and miRNAs in normal and tumor tissues. For this purpose, we used TaqMan gene and miRNA expression assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with specific probes for each gene and miRNA for relative quantification. The reactions were analyzed using the StepOnePlus real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Molecular diagnosis of *H. pylori* was performed by nested PCR for gene *HSP60.* In addition, we also used a bioinformatic tool

'miRNA Data Integration Portal' (http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/) to build an miRNA:mRNA interaction network by using Cytoscape software (version 3.1.1).

Research results

Ours results showed up-regulation of *TNFR2* receptor and its ligand *TNF*, as well as downstream genes of cellular survival as *TRADD, TRAF2*, *CFLIP*, and *NFKB2,* besides *CASP8* and miR-34a in gastric cancer tissues, whereas mediators of apoptosis such as *TNFR1* and *CASP3* were down-regulated. Although we did not observe changes in the expression of most miRNAs, the miRNA:mRNA interactions network suggests a mechanism of regulation mainly by miR-19a and miR-103a, which targets a greater number of genes of the TNF-α pathway.

Research conclusions

Our findings highlight the TNFR2 receptor as up-regulated in gastric cancer tissue, as well as its TNFA ligand, favoring the pro-tumoral effect of this cytokine and transcription of cell survival genes via TNFA/TNFR2 /NF-kB, and down-regulation of TNFR1 and *CASP3* related to apoptosis evasion. Moreover, this pathway can be modulated by an intricate regulatory network of miRNA:mRNA.

Research perspectives

The antitumor effect of TNF-α has been investigated as a form of cancer therapy associated or not with chemotherapeutic agents; however, its toxicity and adverse effects have limited its application. Another strategy for cancer therapy is to block the TNF receptors, so may increase the effectiveness of the TNF-α treatment and decrease its systemic toxicity. Therefore, *in vitro* functional studies may better elucidate the role of these receptors in gastric carcinogenesis.

REFERENCES

1 **The Global Cancer Observatory**. International Agency for Research on Cancer [Internet], 2018. Cancer Today fact Sheets. Available online: http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/7-Stomach-fact-sheet.pdf (accessed on 01.02.2019)

2 **Bockerstett KA**, DiPaolo RJ. Regulation of Gastric Carcinogenesis by Inflammatory Cytokines. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017; **4: 4**7-53 [PMID: 28560288 DOI: 10.1016/j.jcmgh.2017.03.005]

3 **Ferlay J**, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; **136:** E359-386 [PMID: 25220842 DOI: 10.1002/ijc.29210]

4 Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018 - Incidência de câncer no Brasil. 2018. Accessed February 13, 2019 Available online: http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp (accessed on 02.13.2019)

5 **Correa P**. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; **48:** 3554-3560 [PMID: 3288329]

6 **den Hoed CM**, Kuipers EJ. Gastric Cancer: How Can We Reduce the Incidence of this Disease? *Curr Gastroenterol Rep* 2016; **18**: 34 [PMID: 27184043 DOI: 10.1007/s11894-016-0506-0]

7 **Butcher LD**, den Hartog G, Ernst PB, Crowe SE. Oxidative Stress Resulting from *Helicobacter pylori* Infection Contributes to Gastric Carcinogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017; **3**: 316-322 [PMID: 28462373 DOI: 10.1016/j.jcmgh.2017.02.002]

8 **Oshima H**, Ishikawa T, Yoshida GJ, Naoi K, Maeda Y, Naka K, Ju X, Yamada Y, Minamoto T, Mukaida N, Saya H, Oshima M. TNF-α/TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Noxo1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene* 2014; **33**: 3820-3829 [PMID: 23975421 DOI: 10.1038/onc.2013.356]

9 **Ahmad S**, Azid NA, Boer JC, Chen X, Plebanski M, Mohamud R. The Key Role of TNF-TNFR2 interactions in the Modulation of Allergic Inflammation: A review. *Front Immunol* 2018; **9:** 2572 [PMID: 30473698 DOI: 10.3389/fimmu.2018.02572]

10 **Walczak H**. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation and cancer. *Immunol Rev* 2011; **244**: 9-28 [PMID 22017428 DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01066.x]

11 **Ham B**, Fernandez MC, D'Costa Z, Brodt P. The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis. *Trends Cancer Res* 2016, **11**: 1-27 [PMID: 27928197]

12 **Waters JP**, Pober JS, Bradley JR. Tumor necrosis factor and cancer. *J Pathol* 2013; **230**: 241-248 [PMID: 23460481 DOI: 10.1002/path.4188]

13 **Cabal-Hierro L**, Rodríguez M, Artime N, Iglesias J, Ugarte L, Prado MA, Lazo PS. TRAF-mediated modulation of NF-κB and JNK activation by TNFR2. *Cell Signal* 2014; **26**: 2658-2666 [PMID: 25152365 DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.08.011]

14 **Faustman DL**, Davis M. TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine. *Front Immunol* 2013; **4**: 478 [PMID: 24391650 DOI: 10.3389/fimmu.2013.00478]

15 **Marchetti L**, Klein M, Schlett K, Pfizenmaier K, Eisel UL. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 2004; **279**: 32869-32881 [PMID: 15155767 DOI: 10.1074/jbc.M311766200]

16 **Senthikumar C**, Niranjali S, Jayanthi V, Ramesh T, Devaraj H. Molecular and histological evaluation of tumor necrosis factor-alpha expression in Helicobacter pylori-mediated gastric carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; **137**: 577-583 [PMID 20512382 DOI: 10.1007/s00432-010-0921-9]

17 **de Oliveira HS,** Biolchi V, Medeiros HR, Jantsch DBG, Delving LKOB, Reckziegel R, Goettert MI, Brum IS, Pozzobon A. Effect of Helicobacter pylori on NFKB1, p38α and TNF-α mRNA expression levels in human gastric mucosa. *Exp Ther Med* 2016**; 11**: 2365-2371 [PMID: 27284322 DOI: 10.3892/etm.2016.3213]

18 **Salim DK**, Sahin M, Köksoy S, Adanir H, Süleymanlar I. Local Immune Response in *Helicobacter pylori* Infection. *Medicine (Baltimore)* 2016; **95**:e3713 [PMID: 27196487 DOI: 10.1097/MD.0000000000003713]

19 **Rossi AFT**, Cadamuro ACT, Biselli-Périco JM, Leite KRM, Severino FE, Reis PP, Cordeiro JA, Silva AE. Interaction between inflammatory mediators and miRNAs in Helicobacter pylori infection. *Cell Microbiol* 2016; **18**: 1444-1458 [PMID: 26945693 DOI: 10.1111/cmi.12587]

20 **Vlachos IS**, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, Anastasopoulos IL, Maniou S, Karathanou K, Kalfakakou D, Fevgas A, Dalamagas T, Hatzigerogiou AG. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res* 2015; **43(Database issue)**: D153-159 [PMID 25416803 DOI: 10.1093/nar/gku1215]

21 **Dweep H**, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interaction. *Nat Methods* 2015; **12**: 697 [PMID: 26226356 DOI: 10.1038/nmeth.3485]

22 **Chou CH**, Chang NW, Shrestha S, Hsu SD, Lin YL, Lee WH, Yang CD, Hong HC, Wei TY, Tu SJ, Tsai TR, Ho SY, Jian TY, et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res* 2016; **44(D1):** D239-247 [PMID: 26590260 DOI:10.1093/nar/gkv1258]

23 **Wong N**, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res* 2015; **43(Database issue)**: D146-152 [PMID: 25378301 DOI: 10.1093/nar/gku1104]

24 **Wang X**. Improving microRNA target prediction by modeling with unambiguously identified microRNA-target pairs from CLIP-ligation studies. *Bioinformatics* 2016; **32:** 1316-1322 [PMID: 26743510 DOI: 10.1093/bioinformatics/btw002]

25 **Betel D**, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 2008; **36(Database issue)**: D149-153 [PMID: 18158296 DOI: 10.1093/nar/gkm995]

26 **Henry VJ**, Bandrowski AE, Pepin AS, Gonzalez BJ, Desfeux A. OMICtools: an informative directory for multi-omic data analysis. *Database (Oxford)* 2014; 2014: bau069 [PMID: 25024350 DOI: 10.1093/database/bau069]

27 **Agarwal V**, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 2015; **4**: e05005 [PMID: 26267216 DOI:10.7554/eLife.05005]

28 **Miranda KC**, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006, **126**:1203-1217 [PMID: 16990141 DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.031]

29 **Vejnar CE**, Blum M, Zdobnov EM. miRmap web: Comprehensive microRNA target prediction online. *Nucleic Acids Res* 2013; **41(Web Server issue)**: W165-168 [PMID:23716633 DOI: 10.1093/nar/gkt430]

30 **Duarte MC**, Babeto E, Leite KR, Miyazaki K, Borim AA, Rahal P, Silva AE. Expression of TERT in precancerous gastric lesions compared to gastric cancer. *Braz J Med Biol Res* 2011; **44**: 100-104 [PMID: 21180888 DOI: 10.1590/S0100-879X2010007500143]

31 **de Oliveira JG**, Rossi AFT, Nizato DM, Cadamuro ACT, Jorge YC, Valsechi MC, Venâncio LP, Rahal P, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM, Silva AE. Influence of functional polymorphisms in TNF-α, IL-8, and IL-10 cytokine genes on mRNA expression levels and risk of gastric cancer. *Tumour Biol* 2015; **36**: 9159-9170 [PMID: 26088449 DOI: 10.1007/s13277-015-3593-x]

32 **Lauren P**. The two Histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a Histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; **64**: 31-49 [PMID: 14320675]

33 **Singh V**, Mishra S, Rao GR, Jain AK, Dixit VK, Gulati AK, Mahajan D, McClealland M, Nath G. Evaluation of nested PCR in detection of *Helicobacter pylori* targeting a highly conserved gene: HSP60. *Helicobacter* 2008; **13**: 30-34 [PMID: 18205663 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2008.00573.x]

34 **Livak KJ**, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402-408 [PMID:11846609 DOI: 10.1006/meth.2001.1262]

35 **Bustin SA**, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; **55**:611-622 [PMID: 19246619 DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797]

36 **Szklarczyk D**, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015; **43(Database issue)**: D447-452 [PMID: 25352553 DOI: 10.1093/nar/gku1003]

37 **Shannon P**, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; **13**: 2498-2504 [PMID: 14597658 DOI: 10.1101/gr.1239303]

38 Daniel WW; Cross CL. Biostatistics: A Foundation for analysis in the health sciences. 10th ed. Jon Wiley & Sons, Inc., 2013.

39 **Müller-Hermelink N**, Braumüller H, Pichler B, Wieder T, Mailhammer R, Schaak K, Ghoreschi K, Yazdi A, Haubner R, Sander CA, Mocikat R, Schwaiger M, Förster I, Huss R, Weber WA, Kneilling M, Röcken M. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell* 2008; **13:** 507-518 [PMID:18538734 DOI: 10.1016/j.ccr.2008.04.001]

40 **Zhao T**, Li H, Liu Z. Tumor necrosis factor receptor 2 promotes growth of colorectal cancer via the PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett* 2017; **13**:342-346 [PMID: 28123565 DOI: 10.3892/ol.2016.5403]

41 **Al-Lamki RS**, Sadler TJ, Wang J, Reid MJ, Warren AY, Movassagh M, Lu W, Mills IG, Neal DE, Burge J, Vandenebeele P, Pober JS, Bradley JR. Tumor necrosis factor receptor expression and signaling in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2010; **177**: 943-954 [PMID: 20566746 DOI: 10.2353/ajpath.2010.091218]

42 **Sasi SP**, Yan X, Enderling H, Park D, Gilbert HY, Curry C, Coleman C, Hlatky L, Qin G, Kishore R, Goukassian DA. Breaking the 'harmony' of TNF-α signaling for cancer treatment. *Oncogene* 2012; **31**: 4117-4127 [PMID: 22158049 DOI: 10.1038/onc.2011.567]

43 **Rothe M**, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1994; **78**: 681-692 [PMID: 8069916]

44 **Rothe M**, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 1995; **269**: 1424-1427 [PMID: 7544915 DOI: 10.1126/science.7544915]

45 **Rothe M**, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995; **83**: 1243-1252 [PMID: 8548810].

46 **Wang CY**, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappa B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; **281**: 1680-1683 [PMID: 9733516 DOI: 10.1126/science.281.5383.1680]

47 **Micheau O**, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappa B signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 5299-5305 [PMID:11463813 DOI: 10.1128/MCB.21.16.5299-5305.2001]

48 **Park YH**, Jeong MS, Jang SB. Death domain complex of the TNFR-1, TRADD, and RIP1 proteins for death-inducing signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; **443**:1155-1161 [PMID: 24361886 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.068]

49 **Fotin-Mleczek M**, Henkler F, Samel D, Reichwein M, Hausser A, Parmryd I, Scheurich P, Schmid JA, Wajant H. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci* 2002; **115(Pt 13):** 2757-2770 [PMID: 12077366]

50 **Micheau O**, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; **114:** 181-190 [PMID: 12887920 DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00521-X]

51 **Hehlgans T**, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; **115**: 1-20 [PMID: 15819693 DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x]

52 **Irmler M**, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; **388**: 190-195 [PMID: 9217161 DOI: 10.1038/40657]

53 **Li L**, Zhang J, Jin B, Block ER, Patel JM. Nitric oxide upregulation of caspase-8 mRNA expression in lung endothelial cells: role of JAK2/STAT-1 signaling. *Mol Cell Biochem* 2007; **305:** 71-77 [PMID: 17565448 DOI: 10.1007/s11010-007-9529-z]

54 **Ruiz-Ruiz C**, Ruiz de Almodóvar C, Rodriguez A, Ortiz-Ferrón G, Redondo JM, López-Rivas A. The up-regulation of human caspase-8 by interferon-gamma in breast tumor cells requires the induction and action of the transcription factor interferon regulatory factor-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 19712-19720 [PMID: 14993214 DOI: 10.1074/jbc.M313023200]

55 **Kawanishi S**, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M. Nitrative and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells. *Genes Environ* 2017; **38:** 26 [PMID: 28050219 DOI: 10.1186/s41021-016-0055-7]

56 **Xu YH**, Li ZL, Qiu SF. IFN-γ Induces Gastric Cancer Cell Proliferation and Metastasis Through Upregulation of Integrin β3-Mediated NF-κB Signaling. *Transl Oncol* 2018; **11:** 182-192 [PMID: 29306706 DOI: 10.1016/j.tranon.2017.11.008]

57 **Hao NB**, He YF, Li XQ, Wang K, Wang RL. The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer. *Oncotarget* 2017; **8**: 81572-81582 [PMID: 29113415 DOI: 10.18632/oncotarget.19197]

58 **Yang B**, Huang J, Liu H, Guo W, Li G. miR-335 directly, while miR-34a indirectly modulate surviving expression and regulate growth, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells. *Tumour Biol* 2016; **37**: 1771-1779 [PMID: 26318298 DOI: 10.1007/s13277-015-3951-8]

59 **Zhou Y**, Ding BZ, Lin YP, Wang HB. MiR-34a, as a suppressor, enhance the susceptibility of gastric cancer cell to luteolin by directly targeting HK1. *Gene* 2018; **644**: 56-65 [PMID: 29054762 DOI: 10.1016/j.gene.2017.10.046]

60 **Zhang H**, Li S, Yang J, Liu S, Gong X, Yu X. The prognostic value of miR-34a expression in completely resected gastric cancer: tumor recurrence and overall survival. *Int J Clin Exp Med* 2015; **8**: 2635-2641 [PMID: 25932212]

61 **Yao Y**, Suo AL, Li ZF, Liu LY, Tian T, Ni L, Zhang WG, Nan KJ, Song TS, Huang C. MicroRNA profiling of human gastric cancer. *Mol Med Rep* 2009; **2**: 963-970 [PMID: 21475928 DOI: 10.3892/mmr_00000199]

62 **Osawa S**, Shimada Y, Sekine S, Okumur T, Nagata T, Fukuoka J, Tsukada K. MicroRNA profiling of gastric cancer patients from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Oncol Lett* 2011; **2**: 613-619 [PMID: 22848236 DOI: 10.3892/ol.2011.313]

63 **Zhang Y**, Guan DH, Bi RX, Xie J, Yang CH, Jiang YH. Prognostic value of microRNAs in gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017; **8**: 55489-55510 [PMID: 28903436 DOI: 10.18632/oncotarget.18590]

64 **Rotkrua P**, Shimada S, Mogushi K, Akiyama Y, Tanaka h, Yuasa Y. Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using mouse model. *Br J Cancer* 2013; **108**: 932-940 [PMID: 23385731 DOI: 10.1038/bjc.2013.30]

65 **Kim BH**, Hong SW, Kim A, Choi SH, Yoon SO. Prognostic implications for high expression of oncogenic microRNAs in advanced gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 2013; **107**: 505-510 [PMID: 22996433 DOI: 10.1002/jso.23271]

66 **Lu WD**, Zuo Y, Xu Z, Zhang M. MiR-19a promotes epithelial-mesenchymal transition through PI3K/AKT pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2015; **21**: 4564-4573 [PMID: 25914465 DOI: 10.3748/wjg.v21.i15.4564]

67 **Zhou Y**, Li R, Yu H, Wang R, Shen Z. microRNA-130a is an oncomir suppressing the expression of CRMP4 in gastric cancer. *Onco Targets Ther* 2017; **10**:3893-3905 [PMID: 28831264 DOI: 10.2147/OTT.S139443]

68 **Liang J**, Liu X, Xue H, Qiu B, Wei B, Sun K. MicroRNA-103a inhibits gastric cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting c-Myb. *Cell Prolif* 2015; **48**: 78-85 [PMID:25530421 DOI: 10.1111/cpr.12159]

69 **Wang S**, Han H, Hu Y, Yang W, Lv Y, Wang L, Zhang L, Ji J. MicroRNA-130a-3p suppresses cell migration and invasion by inhibition of TBL1XR1-mediated EMT in human gastric carcinoma. *Mol Carcinog* 2018; **57**: 383-392 [PMID: 29091326 DOI: 10.1002/mc.22762]

70 **Zabaglia** LM, Bartolomeu NC, Dos Santos MP, Peruquetti RL, Chen E, Smith MAC, Payão, SLM, Rasmussen LT. Decreased MicroRNA miR-181c Expression Associated with Gastric Cancer. *J Gastrointest Cancer* 2018; **49:** 97-101 [PMID: 29243018 DOI: 10.1007/s12029-017-0042-7]

71 **Cui** M, Yue L, Fu Y, Yu W, Hou X, Zhang X. Association of microRNA-181c expression with the progression and prognosis of human gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2013; **60:** 961-964 [PMID: 23425811 DOI 10.5754/hge121333]

72 **Cadamuro ACT,** Rossi AFT, Maniezzo NM, Silva AE. Helicobacter pylori infection: host immune response, implications on gene expression and microRNAs. *World J Gastroenterol* 2014; **20:** 1424-1437 [PMID: 24587619 DOI: 10.3748/wjg.v20.i6.1424]

73 **Liu M**, Wang Z, Yang S, zhang W, He S, Hu C, Zhu H, Quan L, Bai J, Xu N. TNF-α is a novel target of miR-19a. *Int J Oncol* 2011; **38**: 1013-1022 [PMID: 21271217 DOI: 10.3892/ijo.2011.924]

74 **Guennewig B**, Roos M, Dogar AM, Gebert LF, Zagalak JA, Vongrad V, Metzner KJ, Hall J. Synthetic pre-microRNAs reveal dual-strand activity of miR-34a on TNF-α. *RNA* 2014; **20**: 61-75 [PMID: 24249224 DOI: 10.1261/rna.038968.113]

75 **Zhang J**, Wu H, Li P, Zhao Y, Liu M, Tang H. NF-κB-modulated miR-130a targets TNF-α in cervical cancer cells. *J Transl Med* 2014**; 12**:155 [PMID:24885472 DOI: 10.1186/1479-5876-12-155]

76 **Wang S,** Wu W, Claret FX. Mutual regulation of microRNAs and DNA methylation in human cancers. *Epigenetics* 2017; **12**: 187-197 [PMID:28059592 DOI: 10.1080/15592294.2016.1273308]

FIGURES

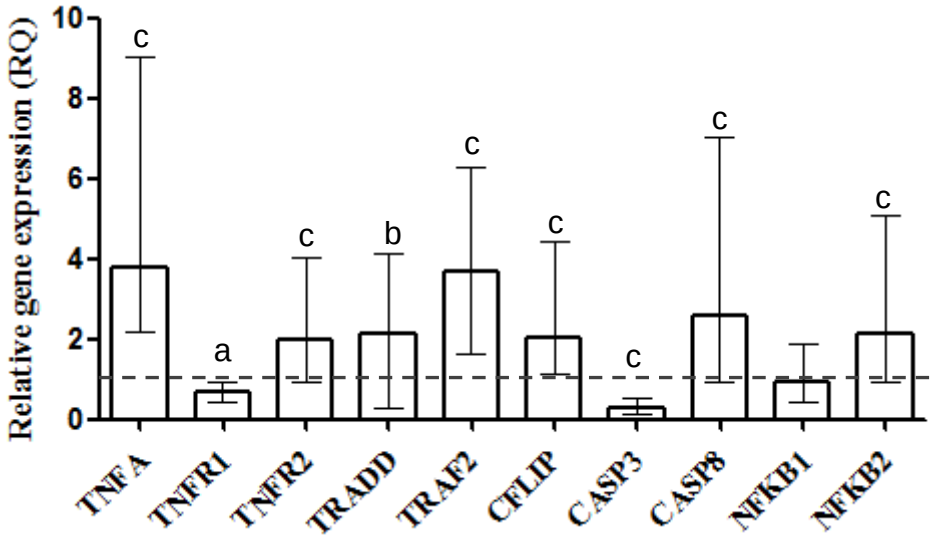


Figure 1: Relative expression of TNF-α pathway genes in gastric cancer. Data are presented as the relative quantification (RQ) median with interquartile range. The line represents the RQ median of normal mucosa. Statistically significant difference, according to the Wilcoxon signed rank test: $^{a}p\leq0.05$; $^{b}p\leq0.01$; $^{c}p\leq0.001$ in relation to normal mucosa and reference genes (*ACTB* and *GAPDH*).

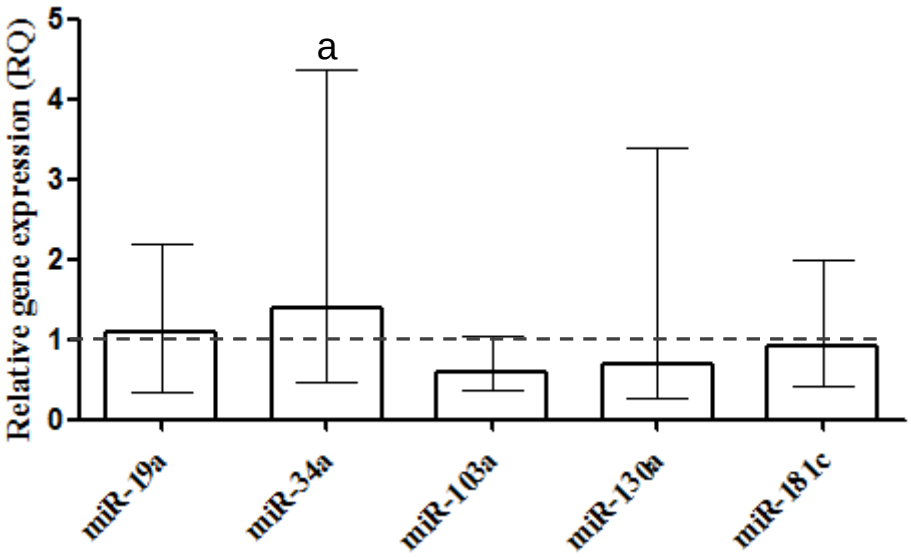


Figure 2: Relative expression of miRNAs miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a and miR-181c in gastric cancer. Data are presented as the relative quantification (RQ) median with interquartile range. The line represents the RQ median of normal mucosa. Statistically significant difference, according to the Wilcoxon signed rank test: $^{a}p \leq 0.05$ in relation to normal mucosa and endogenous RNUs (RNU6B and RNU48).

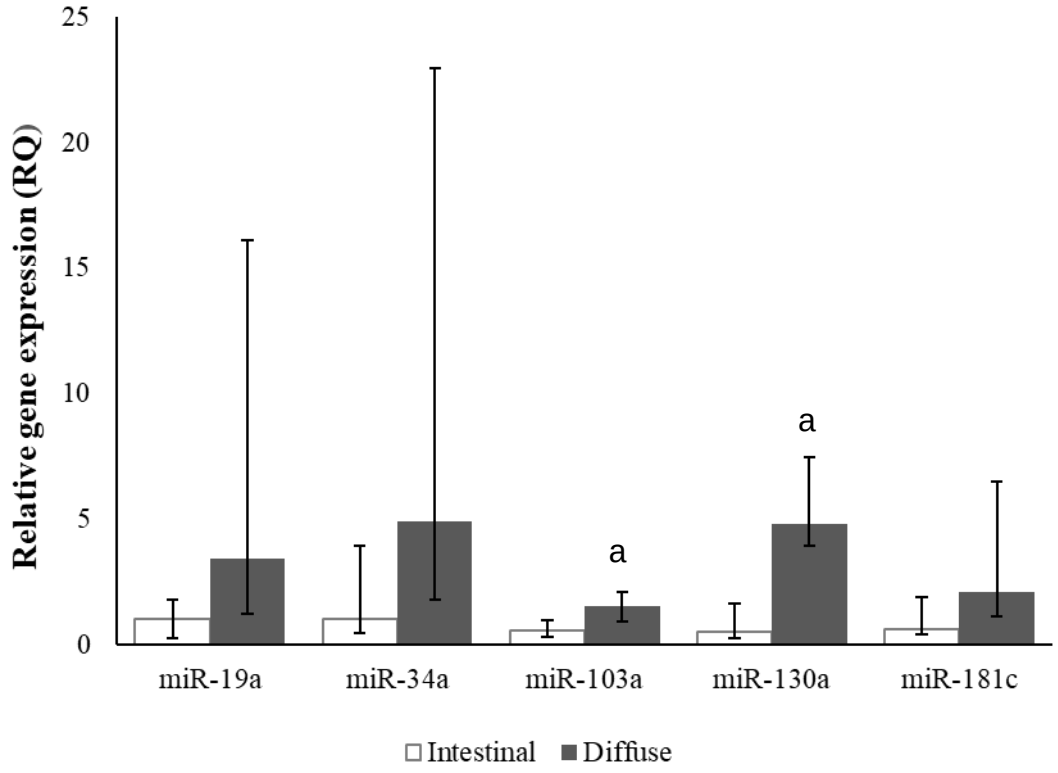


Figure 3: Relative expression of miRNAs miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a and miR-181c in intestinal and diffuse types of gastric cancer. Data are presented as the relative quantification (RQ) median with interquartile range. Statistically significant difference, according to the Mann-Whitney test: $^{a}p \leq 0.05$ comparing the histological types.

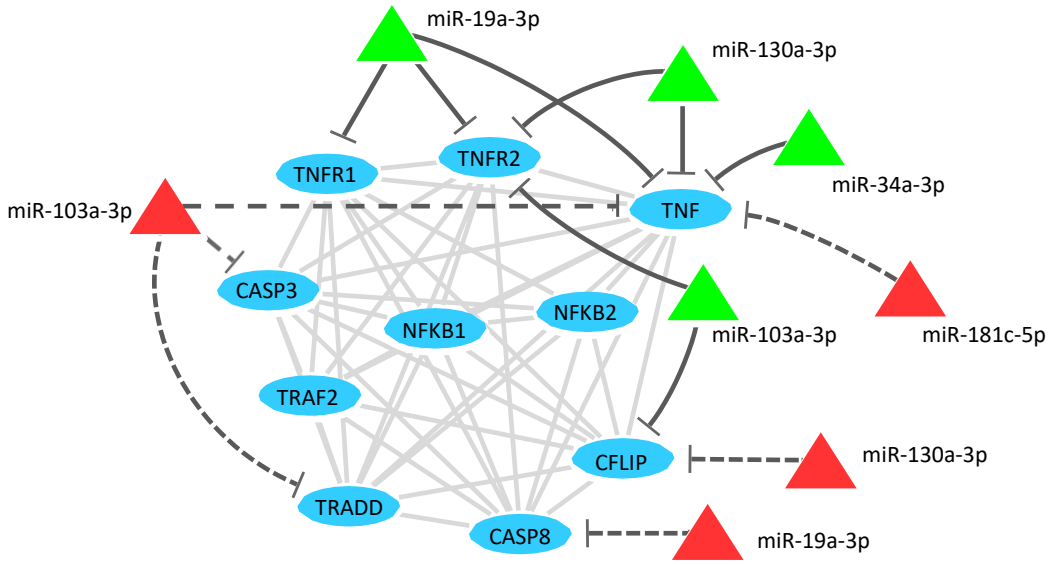


Figure 4: Interaction network showing miRNAs and their predicted and validated targets. The protein interaction network (light gray lines) shows the interaction between proteins (ellipses) encoded by TNF-a pathway genes. Green triangles and solid gray lines represent miRNAs and validated target genes, respectively; red triangles and dotted gray lines represent predicted relationship between miRNA and target genes, respectively.

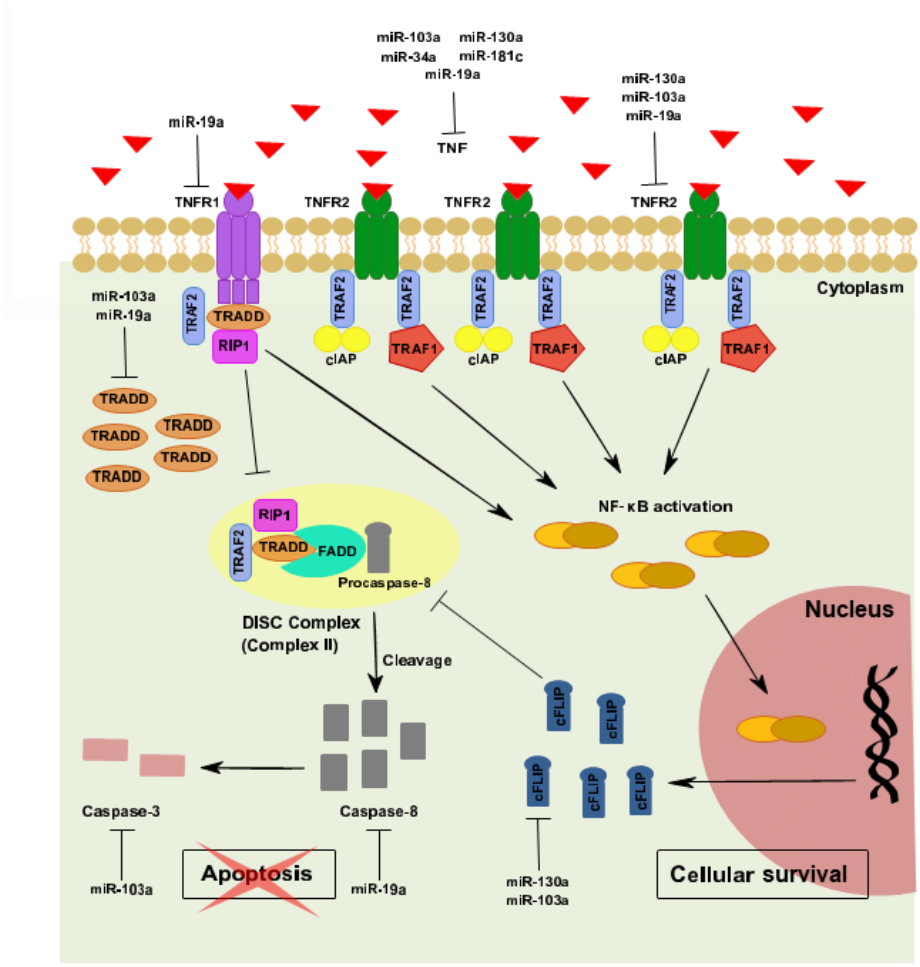


Figure 5: TNF-α signaling in gastric cancer. Up-regulation of TNFR2 and anti-apoptotic mediators results in predominance of cell survival pathway gene expression. After TNF/TNFR2 interaction, TRAF2, TRAF1 and cellular inhibitor of apoptosis (cIAP) bind to the receptor, which results in NF-κB activation and consequent transcription of anti-apoptotic genes, such as cFLIP. Down-regulation of TNFR1 and CASP3 indicate impairment of the apoptotic pathway. Interaction of TRAF2 with TNFR1 through TRADD disturbs formation of the death-inducing signaling complex (DISC) or also called Complex II, which cleaves and activates caspase-8 and caspase-3. In addition, cFLIP induced by NF-κB inhibits activity of the DISC, rendering cells resistant to apoptosis. miRNAs regulate several genes of this pathway by interfering with cellular processes that contribute to gastric carcinogenesis.

TABLES

Table 1 - Characterization of individuals with normal mucosa (NM) and gastric cancer (GC).

Variable	NM N (%)	GC N (%)
Gender		
Female	3 (75.0)	6 (20.0)
Male	1 (25.0)	24 (80.0)
Total	4	30
Age (years) Mean ± SD	30 ± 12,5	65 ± 13.8
	< **30** 3 (75)	< **65** 16 (53.3)
	≥ **30** 1 (25)	≥ **65** 14 (46.7)
Total	4	30
Smoking		
Yes	0 (0)	18 (64.3)
No	4 (100)	10 (35.7)
Total	4	28*
Drinking		
Yes	0 (0)	14 (50.0)
No	4 (100)	14 (50.0)
Total	4	28*
H. pylori		
Positive	0 (0)	15 (50.0)
Negative	4 (100)	15 (50.0)
Total	4	30
Histological Type		
Intestinal	-	26 (86.7)
Diffuse	-	4 (13.3)
Total	-	30

N=number of samples*; SD*=standard deviation; * parameter not available for some individuals

Table 2 - Correlation analysis between mRNA expression and TNF-α pathway genes in gastric cancer.

	TNF	***TNFR1***	***TNFR2***	***TRADD***	***TRAF2***	***CFLIP***	***CASP8***	***CASP3***	***NFKB1***
TNFR1	0,116								
TNFR2	0,452	0,530							
TRADD	0,603	0,222	0,754						
TRAF2	0,610	0,147	0,595	0,801					
CFLIP	0,564	0,367	0,645	0,866	0,811				
CASP8	0,631	0,158	0,616	0,857	0,822	0,907			
CASP3	0,494	0,398	0,539	0,540	0,308	0,567	0,526		
NFKB1	0,621	0,390	0,682	0,790	0,658	0,736	0,690	0,556	
NFKB2	0,669	0,115	0,512	0,822	0,724	0,801	0,796	0,494	0,760

Data are presented as the Spearman correlation coefficient, with significant correlations being highlighted with colors: yellow - $p<0.05$; orange - $p<0.01$; red - $p<0.001$

4 CAPÍTULO II

Manuscrito que será submetido a revista *Scientific Reports*

ISSN 2045-2322

Fator de impacto: 4,011

Name of Journal: Scientific Reports

TNFR1 and TNFR2 downregulation decrease survival gene expression and affect cellular fate in gastric cancer cells

Ana Flávia Teixeira Rossi[1], Fernanda da Silva Manoel-Caetano[1], Joice Matos Biselli[1], Marília de Freitas Calmon Saiki[1], Marcelo Lima Ribeiro[2], Ana Elizabete Silva[1]*

[1] Department of Biology, São Paulo State University – UNESP, São José do Rio Preto – SP, Brazil
[2] Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, São Francisco University – USF, Bragança Paulista – SP, Brazil

Correspondence to: Ana Elizabete Silva, PhD, Department of Biology, São Paulo State University – UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto – SP, 15054-000, Brazil, e-mail: ae.silva@ unesp.br
Telephone: +55 17 3221-2384
Fax: +55 17 32221-2390

Abstract

Chronic inflammation due *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection favor gastric carcinogenesis. The cytokine tumor necrosis factor (TNF)-α is consider a key mediator of inflammation and induces cellular responses, as cell survival and apoptosis, through binding to two receptors: TNFR1 and TNFR2. The regulation of this pathway is accurate and imbalance benefits tumorigenesis process. Here, we investigated the effect of TNFR1 and TNFR2 silencing and treatment with *H. pylori* extract (eHP) in AGS cell line on proliferation, cell cycle, apoptosis and on the expression of mRNA of TNF-α signaling pathway genes and microRNAs (miRNAs) that targeting these mediators. TNFR1 downregulation significantly decreased expression of pro-survival genes and increased expression of apoptotic genes, although no change in cellular process and miRNAs expression was observed. In contrast, TNFR2 downregulation decreased *TRADD* and *TRAF2* expression, both important downstream mediators of TNFR1-mediated pathway, reducing initial apoptosis, besides increasing miRNAs expression and cell-cycle arrest at G2/M. Moreover, eHP increased cell survival and anti-apoptotic genes expression mediated mainly by TNFR1. Taken all together, our findings highlight the important role of both TNFR1 and TNFR2 receptors and *H. pylori* in TNF-α signaling pathway in gastric cancer. Inhibition of both receptors simultaneously may have anti-tumor effect, suggesting possible targets for future therapeutic approach studies in gastric cancer.

Introduction

Gastric cancer (GC) is a major impact neoplasm due to high incidence and mortality in the world mainly in Eastern Asia, Eastern Europe and Latin America[1]. In Brazil, it is the fourth most common in men and the sixth in women[2]. Persistent infection by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) bacterium is the main risk factor of gastric cancer, since it is responsible for chronic inflammation in the gastric mucosa[3]. Consequently, it stimulates the host's immune response, which leads to changes in expression of genes related to inflammation, cell kinetics control and microRNAs (miRNAs)[4,5,6]. Among the genes that stands out after infection by this pathogen is the tumor necrosis factor (TNF)-α, considered a key mediator between inflammation and cancer[7,8].

TNF-α is a pleiotropic cytokine that induces multiple intracellular responses and regulates diverse cellular processes such as cell communication, production of other inflammatory cytokines, besides cell survival, proliferation and apoptosis[9]. This is due to its possibility of binding to two different receptors: TNFR1 (also called TNFRSF1A) or TNFR2 (also called TNFRSF1B)[10]. Both receptors are transmembrane proteins with high similarity in extracellular structure but differ in their intracellular domains, since only TNFR1 presents death domain (DD)[11]. Therefore, TNF-α signaling triggered by TNFR1 is able to induce both cell survival and apoptosis, while TNFR2 results only in cell survival[10,11]. The signaling cascade after TNF-α/TNFR1 binding resulting in cell survival is mediated by activation of nuclear factor (NF)–κB and transcription of pro-survival and anti-apoptosis genes, as cIAP (cellular inhibitor of apoptosis proteins), TRAF2 (TNF receptor associated factor) and cFLIP (CASP8 homolog FLICE-inhibitory protein), and inflammatory cytokines. However, this signal complex is temporary and rapidly dissociates from TNFR1, mediating the binding of the Fas-associated death domain protein (FADD) to form another signal complex, which coordinates downstream signaling of the caspase cascade and apoptosis. In contrast, TNFR2 does not possess a death domain, it induces a long-lasting NF-kB activation by recruit existing cytoplasmic TRAF-2–cIAP-1–cIAP-2 complexes that can inhibit pro-apoptotic factors, maintain cell survival and proliferation[9,11].

Regulation of signal transduction triggered by TNF-α is a constant balance between the opposite function of cellular survival and death, in order to maintain

homeostasis. Thus, imbalance of these processes due changes in expression of receptors, downstream genes, ligand and pro/anti-apoptotic mediators may favor the tumorigenic process[12]. Recent study of our research group showed dysregulation in TNF-α signaling pathway in gastric cancer samples with up-regulation of genes related to cell survival, as well as the TNFR2 receptor, suggesting a prominent pro-tumoral role by TNA-α/TNFR2 binding in gastric neoplasia[13]. Furthermore, we show through a miRNA:mRNA interaction network that this signaling pathway can be regulated by miRNAs. In addition, *H. pylori* infection was also associated with increased expression of TNF-α mRNA and protein and dysregulated miRNA expression in chronic gastritis patients, and the expression pattern of these genes/miRNAs was normalized after bacterial eradication treatment, indicating that this bacterium influences in the host's inflammatory response in part by its action on miRNAs[6].

Based on these results, we decided to investigate the effect of TNFR1 and TNFR2 receptors silencing and of treatment with extract of *H. pylori* (eHP) in AGS gastric cell line on mRNA expression of TNF-α and downstream genes related to its signaling pathway [*TRADD, TRAF2, CFLIP* (*CFLAR*)*, NFKB1, NFKB2, CASP8* and *CASP3*], as well as the same miRNAs previously investigated (miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a and miR-181c)[13], beyond the influence on proliferation, cell cycle and apoptosis. Overall, our results highlight the prominent role of both TNFR1 and TNFR2 receptors in the TNF-α signaling in AGS cell line. While treatment with *H. pylori* extract induces pro-survival gene expression evidencing its pro-tumor action, knockdown of these receptors decreased the expression of important mediators of the TNF-α-mediated cellular survival pathway.

Methods

Cell culture

AGS gastric cancer cells from the Cells Bank of Rio de Janeiro, Brazil (BCRJ code 0311) were incubated at 37 °C and 5% CO_2 with HAM-F10 medium (Cultilab, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1X antibiotic /antimycotic (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Culture medium was replaced every two to three days. The HGC-27 gastric cancer cell line provided by Dr. Marcelo Lima Ribeiro (São Francisco University - USF, SP, Brazil)

was also used in early experiments to choose the lineage for follow-up, and 293T cells of human embryonic kidney, was provided by Dra. Luisa Lina Villa (University of São Paulo – USP, SP, Brazil), for transfection experiments. They were maintained under the same conditions as the AGS cell line except for the culture medium that was Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Treatment with *H. pylori* extract (eHP)

H. pylori extract (eHP) was prepared from clinical isolate of strain cagA+ and vacA s1m1 using density of $5x10^8$ bacteria, according to the protocol described by Li et al. (2007)[14]. Several times (4, 6 and 24 hours) and eHP volume (50, 100, 150 and 200 µL) were tested to verify the best experimental condition. Then $2x10^5$ non-silenced AGS, silenced AGS for TNFR1 (AGS-shR1) and for TNFR2 (AGS-shR2) cells were seeded in 12-wells plates and. After 48 hours, the medium was replaced by 500 µL of HAM-F10 containing 30% v/v eHP or the same proportion of water (control). Cells remained incubated with eHP for 6 hours in an oven at 37°C. For all the experiments, three independent events were done.

Transfection with short hairpin RNA (shRNA)

MISSION® Lentiviral Transduction Particles (Cat. SHCLNV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used to integrate shRNA into genome to knockdown TNFR1 and TNFR2 expression in AGS cell line. Sequence verified viral vectors were purchased from Sigma-Aldrich and the standard manufacturer's protocol was used to generate the cell line. Stable transfected clones were selected by growing the cells in presence of puromycin or G418 selection pressure (for TNFR1: 1 µg/mL of puromycin , and for TNFR2: 400 µg/mL of G418). Different plasmids containing shRNA were used to generate different clones, of which the one showing most efficiency was used for all the experiments. The sequence of the construct was CTTGAAGGAACTACTACTAAG for TNFR1 gene and GCCGGCTCAGAGAATACTATG for TNFR2 genes. TNFR1 and TNFR2 levels were probed by quantitative PCR and western blotting to verify the knockdown. Similar transfections were carried out with empty vector (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which served as transfection control.

Western blot analysis

Protein extraction was performed by the lysis of non-silenced AGS and AGS containing shRNA or empty vector with CelLytic™ MT Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and centrifugation at 12,000 g for 10 min after a 15 minutes incubation. The protein concentration was determined using Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's protocol. 30 µg of protein were separated in 8-12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel by electrophoresis (120 minutes) and transferred to PVDF or nitrocellulose membranes (MilliPore Corporation, Burlington, Massachusetts, EUA) in Electrotransfer TE70XP (Hoefer) for 80 minutes. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk for 60 minutes and then incubated overnight at 4ºC with primary antibodies anti-TNFR1 (dilution 1:500) (Cell Signaling, Massachusetts, USA), anti-TNFR2 (dilution 1:5,000) (Abcam Cambridge, UK) and anti-GAPDH (dilution 1:30,000) (Abcam, Cambridge, UK). Posteriorly, after washing, membranes were incubated at room temperature and under stirring with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (dilution 1:2,000) secondary antibodies (Abcam, Cambridge, UK). Bands were revealed by enhanced chemiluminescence (ECL), visualized in ChemiDoc™ Imaging System (BioRad, Hercules, California, USA) and quantified using Image Lab 6.0 Software (BioRad, Hercules, California, USA).

Quantification of mRNA and miRNA expression by RT-qPCR

After 6 hours of incubation, medium containing eHP or water was removed and total RNA of AGS cells were extracted with miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Complementary DNA (cDNA) for mRNA and miRNA were synthesized using High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), respectively. Quantitative PCR (qPCR) was performed with TaqMan® assays (Applied Biosystems, California, USA) for genes *TNFA, TNFR1 (TNFRSF1A), TNFR2 (TNFRSF1B), TRADD, TRAF2, CFLIP (CFLAR), NFKB1, NFKB2, CASP8* and *CASP3* and for target miRNAs hsa-miR-19a-3p (MIMAT0000073), hsa-miR-34a-3p (MIMAT0004557), hsa-miR-103a-3p (MIMAT0000101), hsa-miR-130a-3p (MIMAT0000425) and hsa-miR-181c-5p

(MIMAT0000258), as described in our previous study[13]. *ACTB* and *GAPDH* genes were used for normalization of mRNA quantification, while for miRNAs were adopted the endogenous RNU6B and RNU48. Relative quantification (RQ) of mRNA and miRNA expression was calculated by the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method[15] using non-silenced AGS without eHP treatment as a calibrator (AGS-C).

Cell proliferation and viability assay

MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was employed to evaluated cell proliferation after treatment with eHP in silenced and non-silenced AGS cell lines. Briefly, culture medium was removed and 300 µL fresh medium containing 1 mg/mL of MTT reagent were added into each well. After 30 minutes of incubation at 37ºC, medium with MTT reagent was replaced by the same volume of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The absorbance at 540 nm was measured using spectrophotometer FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) and the percentage of metabolically active cells calculated in relation to non-silenced AGS.

Cell cycle analysis

Cells distribution at different phases of cell cycle was estimated by measuring the cellular DNA content using flow cytometry. Finished the incubation time with eHP or water, non-silenced AGS, AGS-shR1 and AGS-shR2 cell lines were harvested with trypsin and fixed in 70% ethanol at 4ºC for at least 24 hours. Subsequently, cells were washed, centrifuged and then incubated with 200 µL of Guava® Cell Cycle Reagent (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA) for 30 minutes in the dark. Cell-cycle distribution was measured by Guava® EasyCyte Flow Cytometer and analyzed with Guava® InCyte software (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA).

Apoptosis analysis

Apoptotic cell death was also measured by flow cytometry using FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen™; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ,

USA). After treatment, cells were harvest with Accutase® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and washed with cold phosphate-buffered saline (PBS). After centrifugation, cells were resuspended in binding buffer 1X and stained with 5 µl Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and 5 µl propidium iodide (PI, 50 µg/ml) for 15 minutes at room temperature and in the dark. The marking of cells was evaluated using flow cytometer and analyzed with Guava® InCyte software. From the scatter diagram and quadrant plotting, the results were presented as: living cells (FITC-/PI-) located in the lower left quadrant, early apoptotic cells (FITC+/PI-) in the lower right, late apoptotic cells (FITC+/PI+) in the upper right and necrotic cells (FITC-/PI+) in upper left.

Statistical analysis

Data statistical analysis was performed in GraphPad Prism Software version 6.01 using two-tailed unpaired Student's t-test. Results were expressed as the mean ± standard deviation from experiments conducted in triplicate. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

***TNFA* and its *TNFR1* and *TNFR2* receptors are expressed in AGS cell line**

Initially both AGS and HGC-27 cell lines were cultured to evaluate the mRNA expression levels of *TNFA* and *TNFR1* and *TNFR2* receptors by qPCR. The analyses showed that both cell lines expressed *TNFA* and *TNFR1,* but *TNFR2* presented very low expression in the HGC-27 compared to AGS (Figure S1 – supplementary material). In this way, the AGS cell line was chosen to additional experiments, since it was not reliable to use the HGC-27 in the silencing experiments of TNFR2 receptor.

To standardize treatment conditions, several volumes of eHP (50, 100, 150 and 200 µL) were tested at different incubation times (4, 6 and 24 hours) in the AGS cell line to establish the best conditions to induce expression of *TNFA* without reducing cell viability. The best results were obtained in eHP concentration of 30% v/v (150 µL) for 6 hours of incubation (Figures S2 and S3 - supplementary material). Under these conditions there was an increase in *TNFA* expression (RQ=3.59) without affecting cell viability (98.9%).

Downregulation of TNFR1 and TNFR2: effect on TNF-α signaling downstream genes expression

The effect of TNF-α receptors downregulation on gastric cancer cells were evaluated after transfection of AGS cell line with two specific shRNA for the genes *TNFR1* (called AGS-shR1) and *TNFR2* (called AGS-shR2), followed by antibiotic selection. RT-qPCR and Western blot were used to evaluate the efficiency of silencing. Selected shRNA led to a reduction of 59% for TNFR1 and 56% for TNFR2 in the protein expression (Figure 1).

When we evaluated the expression of TNF-α signaling pathway genes in the AGS stable cell lines with reduced expression of TNFR1 (AGS-shR1-C) and of TNFR2 (AGS-shR2-C) without treatment with eHP in comparison with non-silenced AGS (AGS-C), in general, there was a reduction in expression of genes with anti-apoptotic and/or cellular survival functions (Figure 2). Significantly down-regulated mRNA expression of *TNFA* (RQ = 0.54; p= 0.006), *TNFR1* (RQ = 0.61; p < 0.001)*, NFKB1* (RQ = 0.72; p= 0.013) and *NFKB2* (RQ = 0.66; p= 0.003) was observed in AGS-shR1-C related to AGS-C (Figure 2a, b, i and j), while *CASP3* mRNA (RQ = 1.15; p= 0.014) was up-regulated (Figure 2h). For AGS-shR2-C, *TNFR2* (RQ = 0.50; p < 0.001)*, TRADD* (RQ = 0.35; p= 0.001) and *TRAF2* (RQ = 0.65; p= 0.023) were reduced when compared to AGS-C, as well as *TNFR2* and *TRADD* in comparison with AGS-shR1-C (Figure 2c, d and e).

In contrast, treatment with eHP in non-silenced AGS (AGS-eHP) showed significantly up-regulated mRNA expression of *TNFR1* receptor (Figure 2b)*,* anti-apoptotic and cell proliferation genes, such as *CFLIP, NFKB1* and *NFKB2 (*Figure 2f, i and j*),* while *TNFR2* receptor showed reduced expression (RQ = 0.82; p= 0.005- Figure 2c). Likewise, eHP treatment increased the expression of the *CFLIP* and *NFKB2* in both TNFR1 (AGS-shR1-eHP) and TNFR2 (AGS-shR2-eHP) downregulation cell lines, as also *NFKB1* in AGS-shR1-eHP when compared to the respective untreated lineages (AGS-shR1-C or AGS-shR2-C). However, the expression of these genes is generally smaller in relation to the AGS-eHP, indicating that the reduced expression of TNFR1 and TNFR2 receptors impaired the effect of treatment with eHP in the mRNA expression of these genes (Figures 2f and j). Furthermore, significant decrease was observed in expression of *TNFR2* (RQ = 0.27; p= 0.001) and *CASP8* (RQ = 0.74; p= 0.032) in AGS-shR2-eHP and AGS-shR1-eHP, respectively, compared to the respective untreated lineages (Figure 2c and g).

TNFR2 downregulation up-regulate miR-19a and miR-34a expression

Expression of miRNAs miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a e miR-181c were evaluated in the AGS, AGS-shR1 and AGS-shR2 cell lines with and without eHP treatment. No any significant change of these miRNAs expression was found in AGS and AGS-shR1 regardless of eHP treatment. However, TNFR2 receptor downregulation resulted in a significant increase in the expression of miR-19a and miR-34a in AGS-shR2-C (RQ = 3.17 and 2.64, respectively) compared with AGS-C ($p = 0.029$ and 0.035, respectively) and AGS-shR2-eHP (RQ = 3.89 and 1.93, respectively) in relation to AGS-eHP ($p = 0.022$ and 0.040, respectively) (Figure 3a and b). Increased expression of miR-34a was also observed in AGS-shR2-C when compared to AGS-shR1-C.

TNFR2 downregulation induce cell-cycle arrest at G2/M

Effect of TNFR1 and TNFR2 downregulation after eHP treatment on cell-cycle progression was evaluated by flow cytometry. Overall, both eHP treatment and TNFR1 downregulation did not affect the cellular distribution between the G0/G1, S and G2/M phases. However, TNFR2 downregulation significantly reduced the amount of cells in G0/G1 phase regardless of eHP treatment and lead to an increase of cells in the G2/M phase in AGS-shR2-C compared to AGS-C (Figure 4a and b). In addition, the MTT assay did not show significant difference in the cell proliferation for the AGS cell line independent of receptor expression or eHP treatment (Figure 4c). Therefore, increase in the percentage of cells in G2/M without significant change on proliferation suggested cell-cycle arrest in consequence of TNFR2 downregulation.

Dowregulation of TNFR2 suppress apoptosis and eHP treatment promote necrosis

We also investigated whether the partial inhibition of TNFR1 and TNFR2 and the eHP treatment interfere with the occurrence of apoptosis, which was evaluated through Annexin-V and PI double staining by flow cytometry (Figure 5). Although AGS-shR1(C and eHP) showed no change in apoptosis, percentage of early apoptosis cells was significantly lower in AGS-shR2-C (14.6%) than in AGS-C (27.9%) and AGS-shR1-C (27.0%). No change was observed in the percentage of late apoptosis cells. Furthermore, treatment with eHP in the non-silenced AGS and AGS-shR1 lineages resulted in significant increase of necrosis cells.

Discussion

TNF-α signaling pathway can trigger distinct cellular processes, as cell survival, apoptosis and necrosis, through TNFR1 and TNFR2 receptors, indicating the occurrence of complex regulation after TNF/TNFR binding[16]. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the effect of TNFR1 and TNFR2 downregulation on gastric cancer cell line. Our results showed that TNFR1 downregulation significantly decreased expression of pro-survival genes and increased of apoptotic genes, although no changes in cellular processes and miRNAs expression were observed. In contrast, reduction in TNFR2 expression significantly decreased *TRADD* and *TRAF2*, which may impair the TNFR1-mediated TNF-α signaling, as well as increased the expression of miRNAs, promoting a decrease in apoptosis and cell-cycle arrest at G2/M. Additionally, treatment with *H. pylori* extract increased cell survival and anti-apoptotic genes expression, however the receptors silencing decreased its response intensity.

TNFR1 downregulation resulted in a significant decreased in the expression of *TNFA, NFKB1* and *NFKB2* mRNA, and increased expression of *CASP3,* so may favor the cell death pathway in contrast to the cell survival pathway, although no alteration was observed in apoptosis and cell cycle assays. These findings are in disagreement with the observed in esophageal carcinoma after silencing of *TNFR1* that demonstrated promotion of cell proliferation and reduction in apoptosis rate[17], probably by direct to the TNFR2-mediated TNF-α signaling. Our results showed that reduction in TNFR1 expression negatively influenced the TNF-α expression, which was reduced by about 46% (RQ = 0.54). Zhang and Xiao (2017)[18] also showed more extent inhibition in TNF-α autocrine expression in TNFR1-silenced fibroblast-like synoviocytes compared with TNFR2-silenced. These findings are due to broader role of TNFR1 in NF-kB activation that of TNFR2, since TNF-α expression is regulated by a positive autocrine feedback mechanism triggered mainly by TNFR1[19,20]. Thus, TNFR1 downregulation reduces the expression of *NFKB1* and *NFKB2* mRNAs, which negatively affect the *TNFA* expression and impairs the activation of this signaling pathway.

In contrast, when we reduce the TNFR2 expression significantly decreased the expression of two important mediators for the TNFR1-mediated signaling pathway, TRAF2 and TRADD, as well as reduction of initial apoptosis and cell-cycle

arrest at G2/M. TRADD is an essential adapter protein in TNFR1-mediated apoptotic signaling under physiological conditions[21]. However, dependence of this mediator seens to be cell type-specific[22], once TRADD knockout mice were resistant to TNF-α-induced in a model of hepatitis[23], but this pathway was not impaired completely in macrophages deprived of TRADD[22]. On the other hand, reduced expression of this mediator did not affect *NFKB*1 and *NFKB2* expression in AGS-shR2 indicating that NF-kB activation can occur independently of TRADD through the binding of RIP1 directly to the TNFR1[24,25]. Therefore, ours results showed that TNFR2 downregulation decrease of apoptosis in AGS cell line partially through the reduction of TRADD expression, which does not to influence the activating TNFR1-mediated pro-survival signaling.

Furthermore, AGS-shR2 also presented reduced expression of TRAF2. This protein has an essential role in signal transduction triggered by both TNFR1 and TNFR2 receptors, evidencing the existence of cross-talk between them[25]. Loss of TNFR2 expression led to resistance to TNF-α-mediated cytotoxicity through TRAF2 so that this protein is involved in the apoptosis occurrence stimulated by receptors cooperation[26,27]. Thus, decrease of both TRADD and TRAF2 expression impaired the occurrence of TNFR1-mediated apoptosis after TNFR2 downregulation.

Moreover, we find that TNFR2 downregulation also increased significantly the amount of cells in the G2/M phase and reduced in G0/G1 phase, while no change on cell proliferation was observed, suggesting cell-cycle arrest at G2/M. It could be related to DNA damage response[28]. Recent studies showed increased expression of genes related to response to DNA damage and repair such as *APE1, H2AX* and *PARP-1* in gastric cancer samples possibly influencing the survival of tumor cells[29,30]. Yang et al (2017)[31] demonstrated that TNFR2 enhancing DNA damage repair through regulation of PARP expression in breast cancer cells. Furthermore, they showed that TNFR2 silencing led to pH2AX increase, marker for presence of DNA damage. In the present study, cell-cycle arrest after TNFR2 downregulation suggests decrease in DNA damage repair can be an important anti-tumor mechanism.

Overall, our results highlight the prominent role of TNFR2-mediated TNF-α signaling in gastric cancer. This fact was also observed in samples of patients with gastric cancer in which increased TNFR2 expression and reduction of TNFR1 occurred simultaneously to predominance in the expression of anti-apoptotic (*TNFA, TRAF2, CFLIP* and *NFKB2*) in relation to pro-apoptotic (*CASP3*) mediators[13].

Furthermore, although TNFR1 downregulation in AGS cell line did not change cellular processes, it led to decreased expression of cell survival genes (*TNFA*, *NFKB1* and *NFKB2*) and increase of pro-apoptotic gene, such as *CASP3*, which may have an anti-tumor effect, since inhibition of NF-kB is able to promote cell death and block proliferation[32]. Recent study showed that *NFKB1*- knockdown in GC cell lines and *in vivo* tumorigenicity model resulted in suppression of cell proliferation after 6 days, inhibited cell invasion and induced early apoptosis[33]. Therefore, based on function of each receptor and on the existence of cross-talk between them, the inhibition of both TNFR1 and TNFR2 may together have an anti-tumor effect on gastric cancer. However, should be considered that TNF-α and their receptors besides being expressed by tumor cells are also expressed by cells present in tumor microenvironment, as immune cells[20]. Oshima et al (2014)[8] demonstrated that the stimulation of TNFR1-mediated TNF-α signaling in tumor microenvironment cells promotes gastric tumorigenesis through the induction of tumor-promoting factors, *Noxo1* and *Gna14,* in tumor epithelial cells, highlighting the importance of the tumor microenvironment and the need for *in vivo* studies.

Additionally, considering the important role of miRNAs for the development of cancer, we also evaluated the expression of miRNAs miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a and miR-181c chosen after consulting in public databases [34,35,36,37,38,39,40,41,42,43] and also for interacting with TNF-α pathway genes as observed in our recent study[13]. TNFR1 downregulation and eHP treatment not deregulated miRNAs expression. However, reduced expression of TNFR2 caused up-regulation of miRNAs miR-19a and miR-34a.

Although, the most studies pointed to the tumor-suppressor role of miR-34a[44,45,46], we recently observed overexpression of this miRNA in gastric cancer samples[13], indicating an oncogenic action. Up-regulation of this miRNA in AGS-shR2 suggestes that miR-34a expression can be modulated by TNFR2-mediated TNF-α signaling genes. In contrast, miR-19a has oncogenic function and *TNFA, TNFR1* and TNFR2 are your validates targets[34,35,47]. As well as for miR-34a, TNFR2 downregulation resulted in increase of miR-19a expression in AGS cell line, indicating that miR-19a and TNFR2 relate to each other also in gastric cancer. Furthermore, this miRNA negatively influences apoptosis[48], so that it up-regulation may also contribute to reduction of the apoptotic rate in AGS-shR2. For both

miRNAs, functional studies are needed to assess by what targets they related to TNF-α signaling in gastric cancer.

The other miRNAs evaluated (miR-103a, miR-130a and miR-181c) were not deregulated in AGS cell line. Although recent studies have suggested participation of these miRNAs on gastric cancer[49,50,51,52,53,54], their pro or anti-tumor roles is still controversial. This is due to the influence of several factors in regulation of gene expression, as stage of tumor development and presence or absence of infectious agents[6].

In order to potentiate the expression of TNF-α signaling genes in the AGS cell lines we treated the cell cultures with eHP. Ours results showed a significant increase in expression of the cell survival and anti-apoptotic genes in non-silenced AGS as *TNFR1, NFKB1, NFKB2* and *CFLIP* besides a reduction in *TNFR2* expression after eHP treatment. Likewise, both AGS-shR1 and AGS-shR2 lineages exhibited increased expression of *CFLIP, NFKB2* and/or *NFKB1* after treatment with eHP, although this increase was significantly lower than in the non-silenced AGS. It is also important highlight that eHP significantly decreased *CASP8* expression in AGS-shR1.

H. pylori recognition by gastric epithelial cells in a persistent infection activates the innate and adaptive immune system of the host[4]. Recent study showed increased *TNFA* mRNA levels and other proinflammatory mediators, such as IL-1β and IL-8, in AGS cell line after infection by *H. pylori*[55]. Our results demonstrated high *TNFR1* expression and low of *TNFR2* after eHP treatment in non-silenced AGS, suggesting that *H. pylori* infection promote activation of the TNFR1-mediated TNF-α signaling pathway in the AGS cell line directing signal transduction to the cell survival pathway due to the increase expression of *NFKB1, NFKB2* and *CFLIP.* In agreement studies showed that *H. pylori* activates NF-κB in a manner dependent on the bacterial cells number[56] due to significant IκB-α degradation[57] resulting in the induction of anti-apoptotic genes transcription, such as *CFLIP*[58]. Therefore, our results indicate that *H. pylori* induce cell survival and inflammation also due to TNFR1-mediated TNF-α signaling, which leads to NF-κB activation and consequent production of anti-apoptotic mediators, as cFLIP, regardless of TNFR1 and TNFR2 receptors downregulation that only reduced the response intensity.

In general, regarding the effect of eHP treatment on cellular processes, we did not find alteration in the cell cycle and apoptosis rates in both non-silenced and

silenced AGS cell lines. Wan et al. (2016)[59] showed that AGS cell co-culture with *H. pylori* inhibit apoptosis and increase the viability through upregulation of TRAF1 triggered by NF- κB activation. However, the peak of TRAF1 expression occurs after 12 hours of infection and its effect on cell viability started only after 24 hours. Therefore, the treatment time of cultures and eHP concentration should be an important factor, since with 6 hours of treatment, as used in our study, there were no significant changes in apoptosis and cell cycle. However, we observed that the eHP treatment in non-silenced AGS and AGS-shR1 cells led to a significant increase of necrosis cells. Although the role of necrosis in cancer cells is still much debated[60,61], it is a consensus that TNF-α signaling may induce necrosis mediated by high levels of cFLIP and inhibition of caspase-8[60], what was observed after eHP treatment However, necrosis influence on gastric cancer cells and tumor microenvironment requires further studies.

In conclusion, based on our results, shRNA-mediated downregulation of TNFR1 and TNFR2 receptors in AGS cell line was able to reduced expression of pro-survival and anti-apoptotic genes, besides affecting cellular processes and miRNAs expression, so that inhibition of both receptors simultaneously may have anti-tumor effect in gastric cancer. Furthermore, *H. pylori* extract increased expression of pro-survival genes regardless receptors expression, mainly through TNFR1-mediated TNF-α signaling, emphasizing the role of bacterial infection favoring gastric cancer progression.

References

1. The Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer, 2018. Cancer Today fact Sheets. Available online: http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/7-Stomach-fact-sheet.pdf (accessed on 07.10.2019).

2. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018 - Incidência de câncer no Brasil. 2018. Available online: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf (accessed on 07.10.2019).

3. Yousefi, B. et al. Epigenetic changes in gastric cancer induction by *Helicobacter pylori. J Cell Physiol***.** 10.1002/jcp.28925 (2019).

4. Cadamuro, A.C.T., Rossi, A.F., Maniezzo, N.M. & Silva, A.E. *Helicobacter pylori* infection: Host immune response, implications on gene expression and microRNAs. *World J Gastroenterol.* 20(6):1424-37; 10.3748/wjg.v20.i6.1424 (2014).

5. Cadamuro, A.C. et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on TLR2 and TLR4 expression in patients with gastric lesions. *Mediators Inflamm*. 2015:481972; 10.1155/2015/481972 (2015).

6. Rossi, A.F.T. et al. Interaction between inflammatory mediators and miRNAs in *Helicobacter pylori* infection. *Cell Microbiol*. 18(10): 1444-58; 10.1111/cmi.12587 (2016).

7. Balkwill, F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*. 9(5): 361-71; 10.1038/nrc2628 (2009).

8. Oshima, H. et al. TNF-α/TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of *Noxo1* and *Gna14* in tumor cells. *Oncogene*. 33(29): 3820-9; 10.1038/onc.2013.356 (2014).

9. Yang, S., Wang, J., Brand, D.D. & Zheng, S.G. Role of TNF-TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. *Front Immunol*. 9:784; 10.3389/fimmu.2018.00784 (2018).

10. Faustman, D.L. & Davis, M. TNF receptor 2 and disease: autoimmunity and regenerative medicine. *Front Immunol*. 4:478; 10.3389/fimmu.2013.00478 **(**2013).

11. Josephs, S.F. et al. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. *J Transl Med*. 16(1):242; 10.1186/s12967-018-1611-7 (2018).

12. Brenner, D., Blaser, H. & Mak, T.W. Regulation of tumour necrosis factor signaling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 15(6): 362-74; 10.1038/nri3834 (2015).

13. Rossi, A.F.T., Contiero, J.C., Manoel-Caetano, F.D.S., Severino, F.E. & Silva, A.E. Up-regulation of tumor necrosis factor-α pathway survival genes and of the receptor TNFR2 in gastric cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 11(4):281-294; 10.4251/wjgo.v11.i4.281 (2019).

14. Li, H.Q. et al. Metronidazole-flavonoid derivatives as anti-Helicobacter pylori agents with potent inhibitory activity against HPE-induced interleukin-8 production by AGS cells. *ChemMedChem*. 2(9): 1361-9; 10.1002/cmdc.200700097 (2007).

15. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4):402-8; 10.1006/meth.2001.1262 (2001).

16. Martínez-Reza, I., Díaz, L. & García-Bezerra, R. Preclinical and clinical aspects of TNF-α amd its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer. *J Biomed Sci.* 24(1):90; 10.1186/s12929-017-0398-9 (2017).

17. Changhui, M. et al. Silencing of tumor necrosis factor receptor 1 by siRNA in EC109 cells affects cell proliferation and apoptosis. *J Biomed Biotechnol.* 2009:760540; 10.1155/2009/760540 (2009).

18. Zhang, H. & Xiao, W. TNFR1 and TNFR2 differentially mediate TNF-α-induced inflammatory responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Cell Biol Int.* 41(4): 415-22; 10.1002/cbin.10735 (2017).

19. Verma, N., Chaudhury, I., Kumar, D. & Das, R.H. Silencing of TNF-alpha receptors coordinately suppresses TNFalpha expression through NF-kappaB activation blockade in THP-1 macrophage. *FEBS Lett*. 583(17): 2968-74; 10.1016/j.febslet.2009.08.007 (2009).

20. Wu, Y. & Zhou, B.P. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*. 102(4): 639-44; 10.1038/sj.bjc.6605530 (2010).

21. Pobezinskaya, Y.L. & Liu, Z. The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle.* 11(5): 871-6; 10.4161/cc.11.5.19300 (2012).

22. Pobezinskaya, Y.L. et al. The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 9(9): 1047-54; 10.1038/ni.1639 (2008).

23. Ermolaeva, M.A. et al. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory response. *Nat Immunol*. 9(9): 1037-46; 10.1038/ni.1638 (2008).

24. Chen, N.J. et al. Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA***.** 105(34):12429-34; 10.1073/pnas.0806585105 (2008).

25. Naudé, P.J., den Boer, J.A., Luiten, P.G. & Eisel, U.L. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J*. 278(6): 888-98; 10.1111/j.1742-4658.2011.08017.x (2011).

26. Meager, A., Sampson, L.E., Grell, M. & Scheurich, P. Development of resistance to tumour necrosis factor (TNF alpha) in KYM-1 cells involves both TNF receptors. *Cytokine*. 5(6): 556-63 (1993).

27. Declercq, W., Denecker, G., Fiers, W. & Vandenabeele, P. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol*. 161(1):390-9 (1998).

28. DiPaola, R.S. To Arrest or Not To G(2)-M Cell-Cycle Arrest. *Clin Cancer Res*. 8(11): 3311-4 (2002).

29. Afzal, H. et al. PARP1: A potential biomarker for gastric cancer. *Pathol Res Pract.* 152472; 10.1016/j.prp.2019.152472 (2019).

30. Manoel-Caetano, F.S., Rossi, A.F.T., Calvet de Morais, G., Severino, F.E. & Silva, A.E. Upregulation of the *APE1* and *H2AX* genes and miRNAs involved in DNA damage response and repair in gastric cancer. *Genes Dis.* 6(2): 176-184; 10.1016/j.gendis.2019.03.007 (2019).

31. Yang, F., Zhao, N. & Wu, N. TNFR2 promotes Adriamycin resistance in breast cancer cells by repairing DNA damage. *Mol Med Rep.* 16(3): 2962-2968; 10.3892/mmr.2017.6898 (2017).

32. Sokolova, O. & Naumann, M. NF-kB Signaling in Gastric Cancer. *Toxins (Basel).* 9(4); 10.3390/toxins9040119 (2017).

33. Huang, T. et al. miR-508-3p concordantly silences NFKB1 and RELA to inactive canonical NF-kB signaling in gastric carcinogenesis. *Mol Cancer.* 15:9; 10.1186/s12943-016-0493-7 (2016).

34. Vlachos, I.S. et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue): D153-9; 10.1093/nar/gku1215 (2015).

35. Dweep, H. & Gretz, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interaction. *Nat Methods.* 12(8):697; 10.1038/nmeth.3485 (2015).

36. Chou, C.H. et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.* 44(D1): D239-47; 10.1093/nar/gkv1258 (2016).

37. Wong, N. & Wang, X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue): D146-52; 10.1093/nar/gku1104 (2015).

38. Wang, X. Improving microRNA target prediction by modeling with unambiguously identified microRNA-target pairs from CLIP-ligation studies. *Bioinformatics.* 32(9): 1316-22; 10.1093/bioinformatics/btw002 (2016).

39. Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S. & Sander, C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue): D149-53; 10.1093/nar/gkm995 (2008).

40. Henry, V.J., Bandrowski, A.E., Pepin, A.S., Gonzalez, B.J. & Desfeux, A. OMICtools: an informative directory for multi-omic data analysis. *Database (Oxford).* 2014. Pii: bau069; 10.1093/database/bau069 (2014).

41. Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.W. & Bartel, D.P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.* 4: e0500510.7554/eLife.05005 (2015).

42. Miranda, K.C. et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell.* 126(6):1203-17; 10.1016/j.cell.2006.07.031 (2006).

43. Vejnar, C.E., Blum, M. & Zdobnov, E.M. miRmap web: Comprehensive microRNA target prediction online. *Nucleic Acids Res.* 41(Web Server issue): W165-8; 10.1093/nar/gkt430 (2013).

44. Deng, X. et al. MicroRNA-34a regulates proliferation and apoptosis of gastric cancer cells by targeting silent information regulator 1. *Exp Ther Med.* 15(4): 3705-3714; 10.3892/etm.2018.5920 (2018).

45. Yu, Y., Wei, S.G., Weiss, R.M. & Felder, R.B. TNF-α receptor 1 knockdown in the subfornical organ ameliorates sympathetic excitation and cardiac hemodynamics in heart failure rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 313(4): H744-H756; 10.1152/ajpheart.00280.2017 (2017).

46. Wang, B. et al. miR-34a directly targets tRNAiMet precursors and affects cellular proliferation, cell cycle, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 115(28): 7392-7397; 10.1073/pnas.1703029115 (2018).

47. Liu, M. TNF-α is a novel target of miR-19a. *Int J Oncol.* 38(4): 1013-22; 10.3892/ijo.2011.924 (2011).

48. Zhao, D. et al. MiR-19a regulates the cell growth and apoptosis of osteosarcoma stem cells by targeting PTEN. *Tumour Biol*. 39(5): 1010428317705341; 10.1177/1010428317705341 (2017).

49. Cui, M. et al. Association of microRNA-181c expression with the progression and prognosis of human gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 60(125): 961-4; 10.5754/hge121333 (2013).

50. Liang, J. et al. MicroRNA-103a inhibits gastric cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting c-Myb. *Cell Prolif.* 48(1):78-85; 10.1111/cpr.12159 (2015).

51. Zhou, Y., Li, R., Yu, H., Wang, R. & Shen, Z. microRNA-130a is an oncomir suppressing the expression of CRMP4 in gastric cancer. *Onco Targets Ther.* 10: 3893-3905; 10.2147/OTT.S139443 (2017).

52. Hu, X. et al. miRNA-103a-3p promotes human gastric cancer proliferation by targeting and suppressing ATF7 *in vitro. Mol Cells.* 41(5): 390-400; 10.14348/molcells.2018.2078 (2018).

53. Wang, S. et al. MicroRNA-130a-3p suppresses cell migration and invasion by inhibition of TBL1XR1-mediated EMT in human gastric carcinoma. *Mol Carcinog.* 57(3):383-392; 10.1002/mc.22762 (2018).

54. Zabaglia, L.M. et al. Decreased MicroRNA miR-181c Expression Associated with Gastric Cancer. *J Gastrointest Cancer.* 49(1):97-101; 10.1007/s12029-017-0042-7 (2018).

55. Yeon, M.J. et al. Anti-inflammatory effects of Kaempferol on Helicobacter pylori-induced inflammation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 83(1): 166-173; 10.1080/09168451.2018.1528140 (2019).

56. Maeda, S. et al. *H. pylori* activates NF-kappaB through a signaling pathway involving IkappaB kinases, NF-kappaB–inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells. *Gastroenterology*. 119(1):97-108; 10.1053/gast.2000.8540 (2000).

57. Ham, B., Fernandez, M.C., D'Costa, Z. & Brodt, P. The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis. *Trends Cancer Res.* 11(1): 1-27 (2016).

58. Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. & Tschopp, J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol.* 21(16): 5299-5305; 10.1128/MCB.21.16.5299-5305.2001 (2001).

59. Wan, X.K. et al. *Helicobacter pylori* inhibits the cleavage of TRAF1 via a CagA-dependent mechanism. *World J Gastroenterol.* 22(48):10566-10574; 10.3748/wjg.v22.i48.10566 (2016).

60. Meng, M.B. et al. Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. *Oncotarget.* 7(35): 57391-57413; 10.18632/oncotarget.10548 (2016).

61. Najafov, A., Chen, H. & Yuan, J. Necroptosis and Cancer. *Trends Cancer.* 3(4): 294-301; 10.1016/j.trecan.2017.03.002 2017.

Acknowledgements

This work was supported by São Paulo Research Foundation -FAPESP [grants number 2015/21464-0 and 2015/23392-7] and National Counsel of Technological and Scientific Development – CNPq [grant number 310120/2015-2]. We thank Dr. Sonia Maria Oliani, Departament of Biology, UNESP, by making the flow cytometer available, and Janesly Prates for training in the flow cytometer.

Author Contributions

AFTR and AES outlined the study. AFTR and MFCS built experimental design. MLR produced the *H. pylori* extract. AFTR, FSMC and JMB performed the experiments. AFTR analyzed and interpreted the results. AFTR and AES drafted the manuscript and revised it. All authors approved the final version of the manuscript.

Data Availability

The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Figures

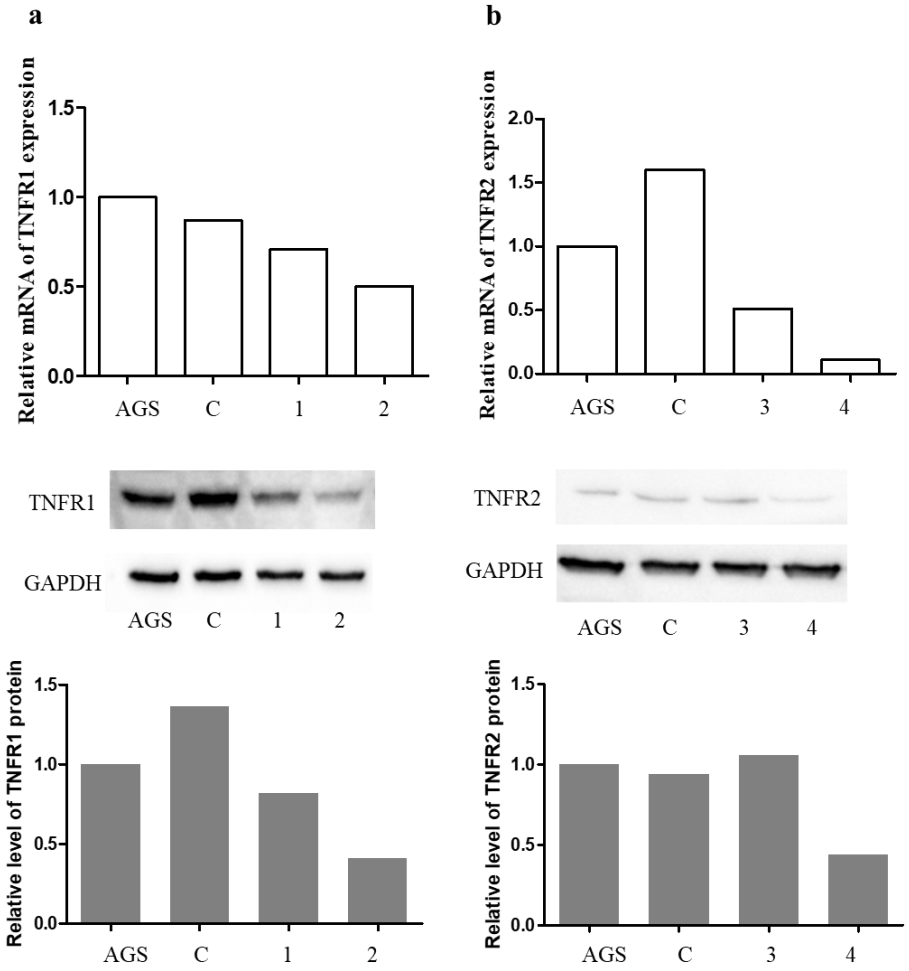


Figure 1. Downregulation of TNFR1 (a) and TNFR2 receptors (b) in AGS cell line. Silencing efficiency was evaluated by RT-qPCR and Western blot, which confirmed the reduction in the expression of TNFR1 and TNFR2 receptors for shRNA 2 and 4, respectively. AGS = non-silencing cell line; C = control transfected with empty vector; 1 and 2 = different shRNA clones for TNFR1; 3 and 4 = different shRNA clones for TNFR2.

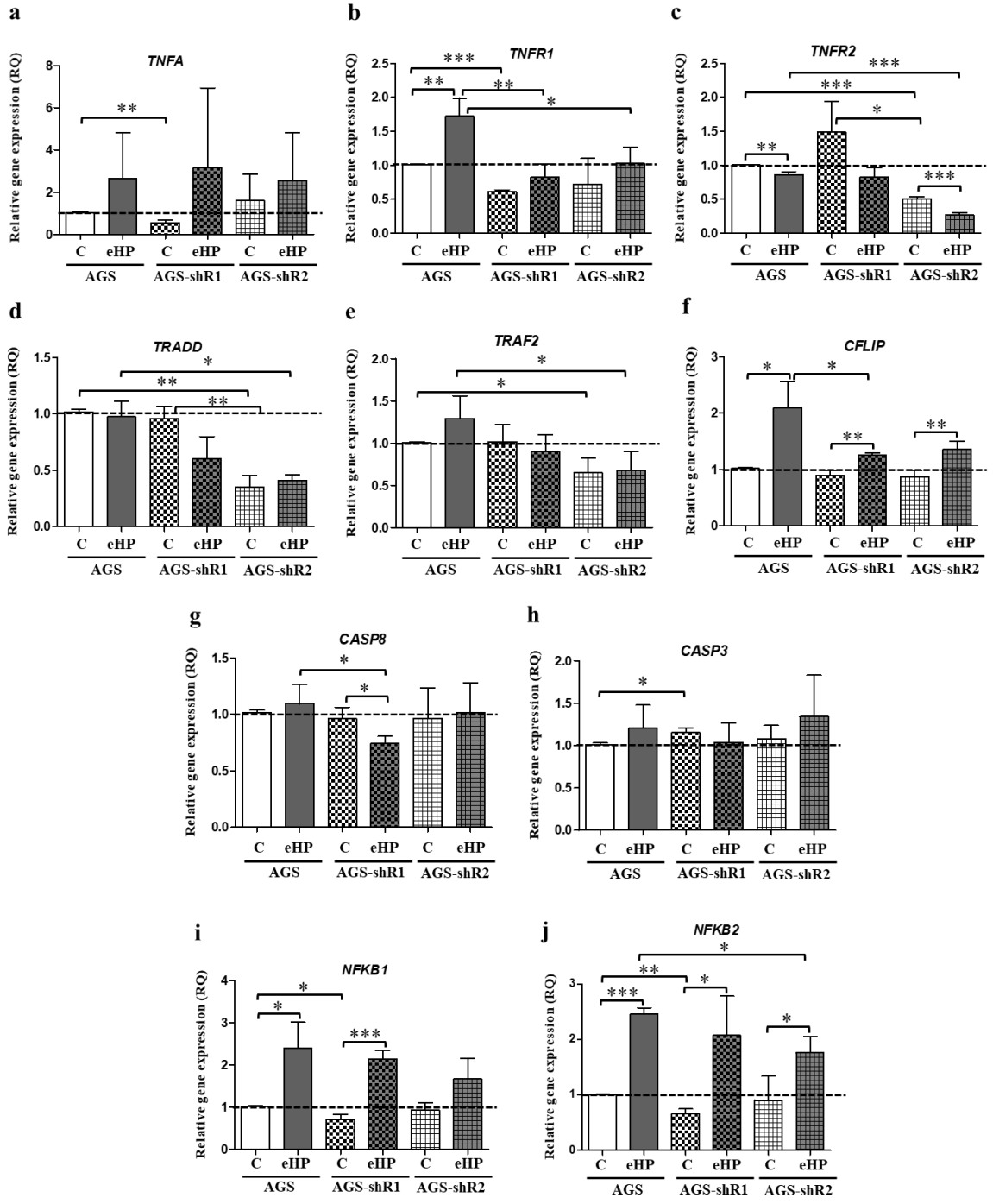


Figure 2. Relative expression of TNF-α signaling pathway genes: *TNFA* (a), *TNFR1* (b), *TNFR2* (c), *TRADD* (d), *TRAF2* (e), *CFLIP* (f), *CASP8* (g), *CASP3* (h), *NFKB1* (i) and *NFKB2* (j) in non-silenced AGS, downregulated for TNFR1 (AGS-shR1), downregulated for TNFR2 (AGS-shR2) without treatment (C) and treated with extract of *H. pylori* (eHP). Bars represents mean ± SD of the three independent events. Dotted line represents RQ mean of AGS-C. Statistically significant difference, according to the t-test: *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.00.

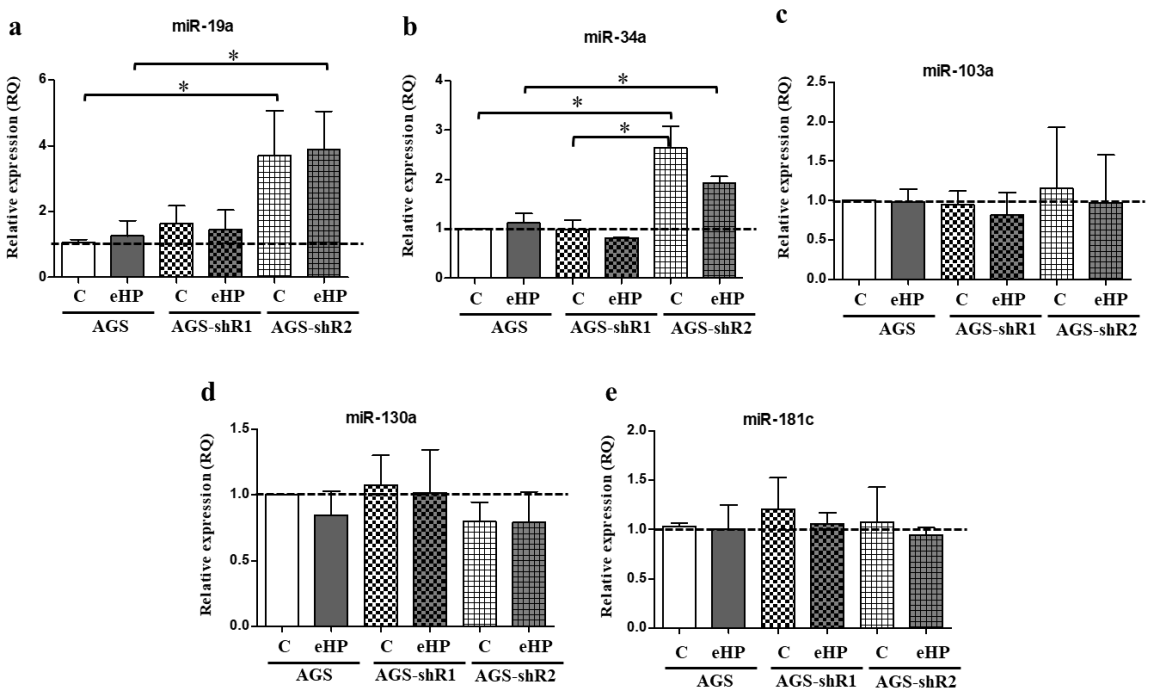


Figure 3. Relative expression of miRNAs related to TNF-α pathway: miR-19a (a), miR-34a (b), miR-103a (c), miR-130a (d) and miR-181c (e) in non-silenced AGS, downregulated for TNFR1 (AGS-shR1), downregulated for TNFR2 (AGS-shR2) without treatment (C) and treated with extract of *H. pylori* (eHP). Bars represent mean ± SD of the three independent events. Dotted line represents RQ mean of AGS-C. Statistically significant difference, according to the t-test: *p≤0.05.

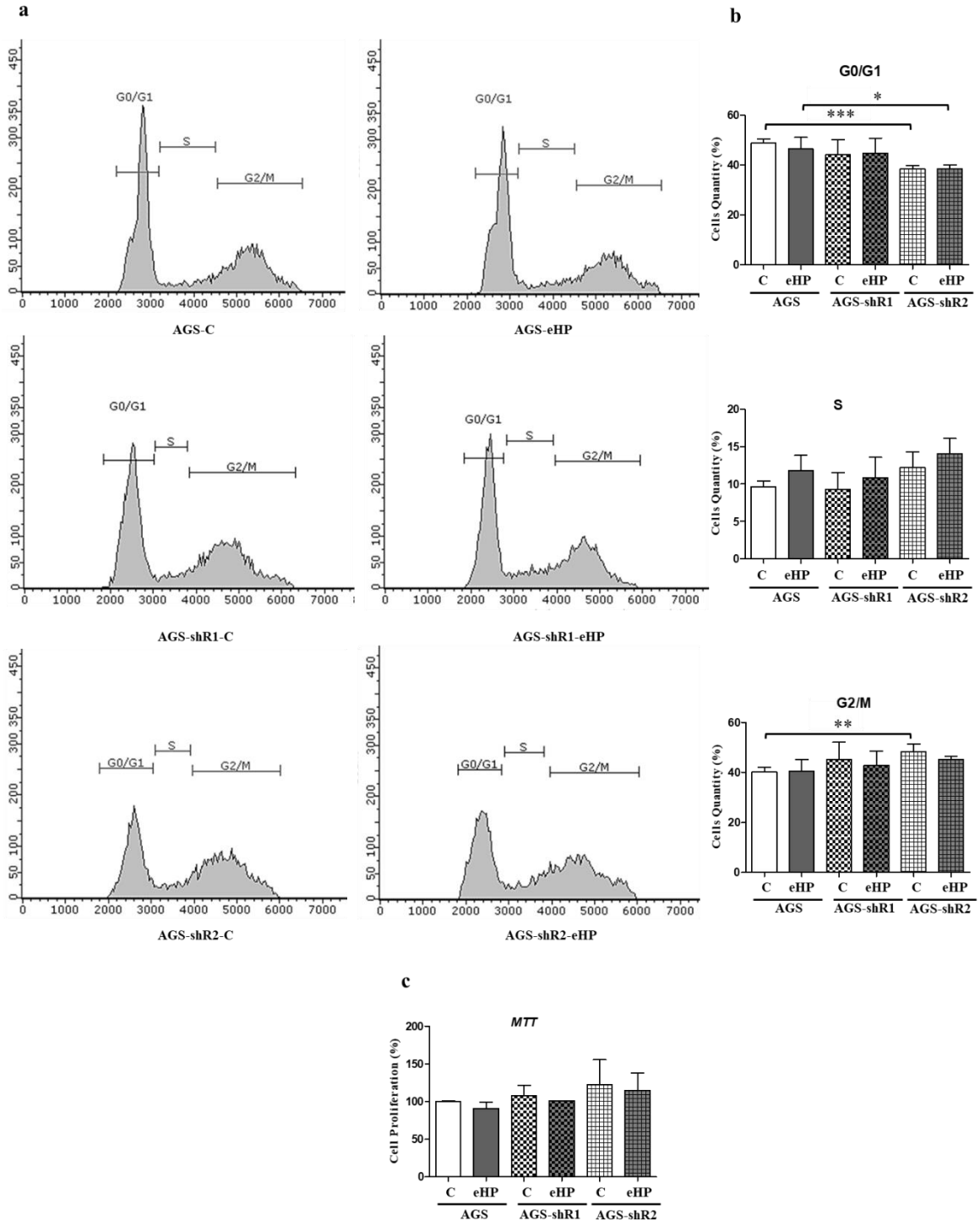


Figure 4. TNFR2 downregulation leads to cell-cycle arrest at G2/M phase. **a:** Graphs present the amount of cells in the different phases of cell cycle in non-silenced AGS, downregulated for TNFR1 (AGS-shR1), downregulated for TNFR2 (AGS-shR2) without treatment (C) and treated with extract of *H. pylori* (eHP). **b:** Bars represent mean ± SD of the three independent events. Statistically significant difference, according to the t-test: *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.00. **c:** Percentage of cells in proliferation by MTT assay.

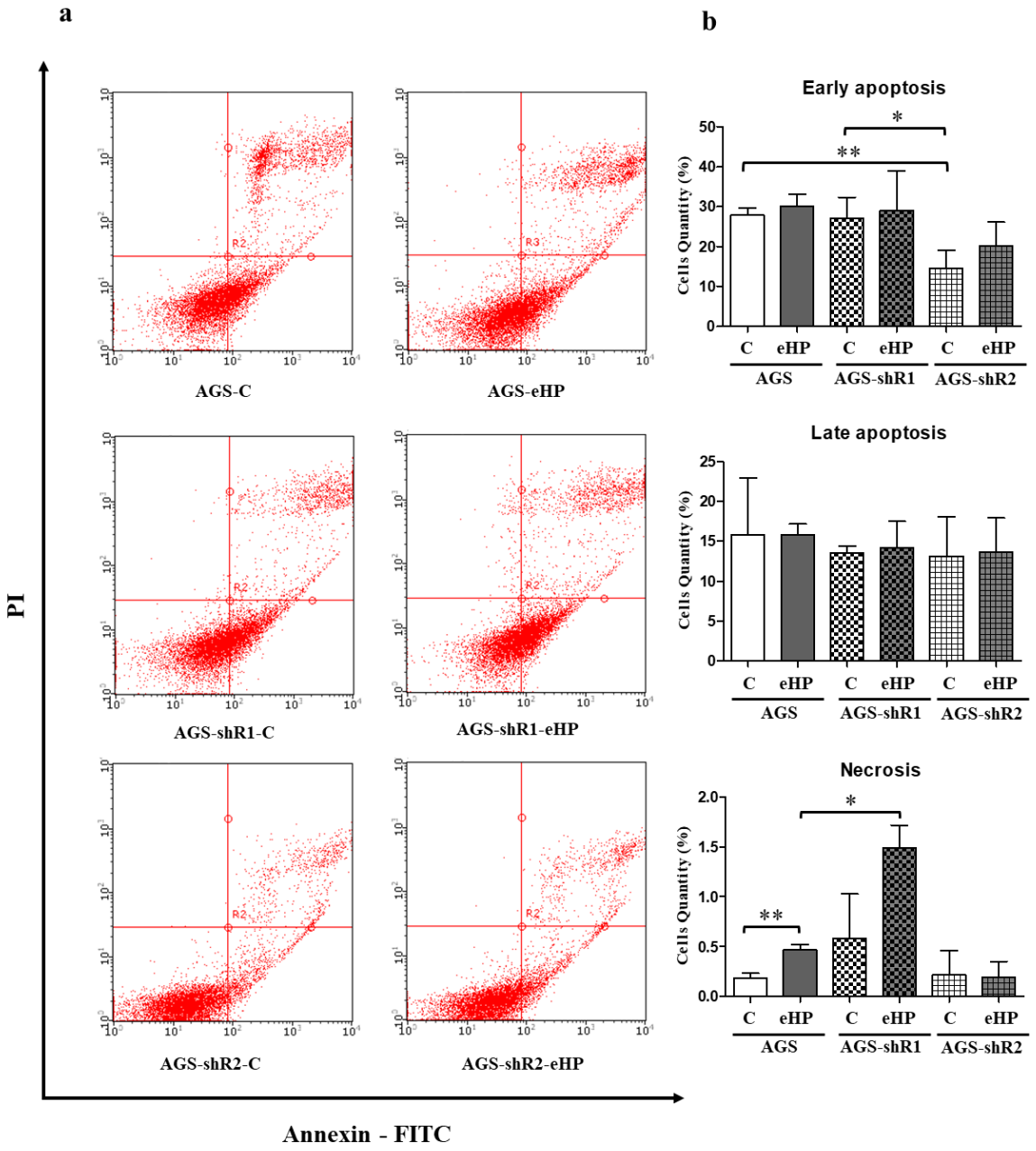


Figure 5. Apoptosis analysis in non-silenced AGS, downregulated for TNFR1 (AGS-shR1), downregulated for TNFR2 (AGS-shR2) without treatment (C) and treated with extract of *H. pylori* (eHP). **a:** Representative images of the cells distribution in the different quadrants indicating viable cells (Annexin V - / PI -) in the lower left, early apoptotic cells (Annexin V + / PI -) in the lower right, late apoptotic cells (Annexin V + / PI +) in the upper right and necrotic cells (Annexin V - / PI +) in upper left. **b:** Bars represents mean ± SD of the three independent events. Statistically significant difference, according to the t-test: *p≤0.05; **p≤0.01.

Supplementary materials

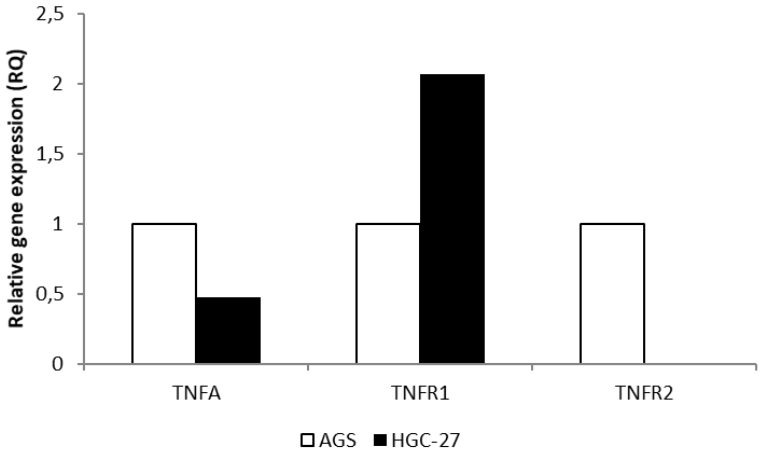


Figure S1: Relative expression of *TNFA, TNFR1* and *TNFR2* genes in AGS and HGC-27 gastric cancer cell lines. The graph shows that both lines express *TNFA* and *TNFR1* mRNA, whereas *TNFR2* expression was very low in the HGC-27 (RQ = 0.0001) relative to AGS cell line (RQ = 1.0). *ACTB* and *GAPDH* were used for normalization of mRNA quantification.

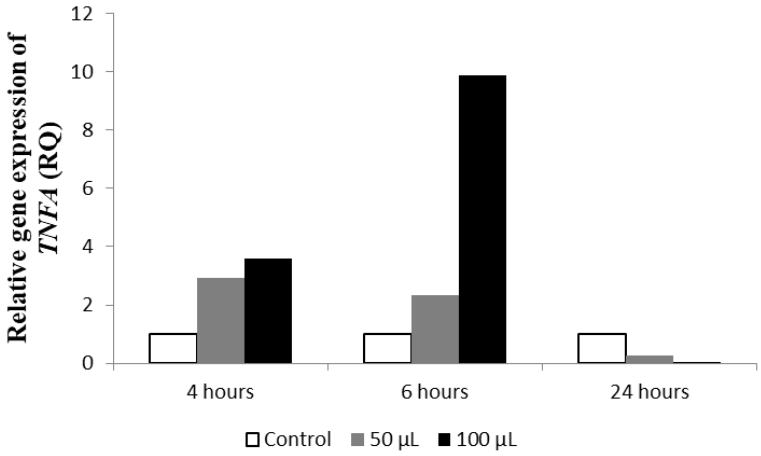


Figure S2: Relative gene expression of *TNFA* in the AGS cell line after treatment with *H. pylori* extract (eHP) at the incubation time of 4, 6 and 24 hours and in the eHP volumes of 50 and 100 µL. As shown in the figure, *TNFA* expression was higher for the eHP volume of 100 µL after 6 hours incubation (RQ = 9.56). In 24 hours treatment, *TNFA* expression was less than one. From these data, the incubation time of 6 hours was chosen. *ACTB* and *GAPDH* were used for normalization of mRNA quantification. Control was AGS cell line maintained with complete culture medium added with water in the same volume used in eHP.

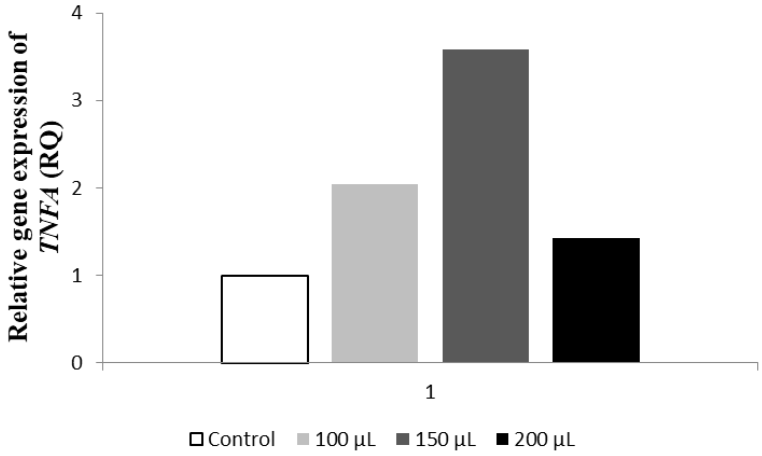


Figure S3: Relative gene expression of *TNFA* in the AGS cell line after treatment with *H. pylori* extract (eHP) volumes of 100, 150 and 200 µL for 6 hours. Data show a progressive increase in *TNFA* expression in the eHP volumes of 100 (RQ = 2.04) and 150 µL (RQ = 3.59) compared to control. Reduced expression of *TNFA* was observed in the treatment with 200 µL of eHP (RQ = 1.42). *ACTB* and *GAPDH* were used for normalization of mRNA quantification. Control was AGS cell line maintained with complete culture medium added with water in the same volume used in eHP.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a investigar a expressão de vários genes envolvidos na via de TNF-α em amostras de câncer gástrico e se o silenciamento dos receptores TNFR1 e TNFR2 em linhagem celular AGS afeta a expressão destes genes e, consequentemente, os processos celulares de proliferação, ciclo celular e apoptose. Além disto, avaliamos se a infecção pela *H. pylori* e miRNAs podem influenciar na desregulação desta via de sinalização, afetando o destino celular. De modo geral, nossos resultados mostraram que a via de sinalização de TNF-α está desregulada em câncer gástrico favorecendo a expressão de genes anti-apoptóticos e de sobrevivência celular. Nas amostras de pacientes, observamos aumento na expressão de *TNFA,* do receptor *TNFR2,* de genes relacionados a transdução de sinal intracelular, como *TRAF2* e *TRADD,* genes envolvidos com sobrevivência celular, como *NFKB2 e CFLIP,* além de *CASP8* e do miRNA miR-34a. Por outro lado, *TNFR1* e *CASP3* apresentaram expressão reduzida. Estes resultados indicam um predomínio da expressão de mediadores de proliferação celular em relação aos pró-apoptóticos, indicando que esta via está promovendo a sobrevivência celular por meio de TNF-α/TNFR2/NF-κB em detrimento da apoptose nas amostras de câncer gástrico. Contudo a infecção pela *H. pylori* não influenciou na expressão dos genes analisados, mas a rede de interação miRNA:RNAm mostrou uma relação importante dos miRNAs na regulação da expressão dos genes dessa via. Em linhagem celular de câncer gástrico, o silenciamento parcial de TNFR1 significantemente reduziu a expressão dos genes *TNFA, NFKB1* e *NFKB2*, relacionados a sobrevivência celular, e aumentou a expressão de *CASP3,* caspase efetora da apoptose, embora não tenha ocorrido mudanças nos processos celulares e nem na expressão de miRNAs. Por outro lado, silenciamento de TNFR2 reduziu a expressão de *TRADD* e *TRAF2* e aumentou a expressão dos miRNAs miR-19a e miR-34a, o que levou a diminuição na taxa de apoptose e parada do ciclo celular na fase G2/M. Quando as linhagens foram tratadas com extrato de *H. pylori* constatamos, independentemente da expressão dos receptores, aumento na expressão de *TNFR1,* dos genes pró-sobrevivência *CFLIP, NFKB1* e *NFKB2*, além de redução do receptor *TNFR2.* Portanto, nossos resultados destacam a importância da via de TNF-α em câncer gástrico, que parece ser mediada principalmente por TNFR2 no tecido tumoral, promovendo a sobrevivência e proliferação celular, enquanto em linhagem celular AGS, a via de sobrevivência celular e pró-inflamatória é mediada principalmente pelo

receptor TNFR1 em condição de inflamação induzida pelo extrato da *H. pylori*, a qual é acentuada também pelo receptor TNFR2, evidenciando uma atuação conjunta de ambos receptores.

Como já destacado, TNFR1 e TNFR2 diferem nos seus domínios intracelulares e na expressão celular (YANG et al., 2018a) e, assim, a influencia de cada receptor na via de sinalização desencadeada por TNF-α varia em diferentes condições patológicas (HAUWERMEIREN; VANDERNBROUCKE; LEBERT., 2011), com predomínio de TNFR1 no favorecimento de falha cardíaca (YU et al., 2017) e artrite reumatoide (ZHANG; XIAO, 2017), e de TNFR2 em câncer colorretal (ZHAO; LI; LIU, 2017), carcinoma renal de células claras (AL-LAMKI et al., 2010) e carcinoma hepatocelular (JING et al., 2018). Nosso estudo demonstra, pela primeira vez, a importância desta via de sinalização mediada por TNFR2/TNFR1 também no favorecimento do câncer gástrico.

Aumento na expressão de *TNFA, TNFR2, TRAF2, NFKB2* e *CFLIP* nas amostras de câncer gástrico (Figura 5 em ROSSI et al., 2019) indica que a via de sobrevivência celular resultante da ligação TNF-α/TNFR2 está ativada, uma vez que, a partir do recrutamento de TRAF2, TNFR2 ativa o fator de transcrição nuclear NF-κB, o qual induz a transcrição de genes anti-apoptóticos, como *CFLIP* e *TRAF2* (WANG et al., 1998; MICHEAU et al., 2001). Por outro lado, a expressão reduzida de *TNFR1* e *CASP3* indica um prejuízo da via apoptótica. Após ligação TNF-α/TNFR1, TRADD recruta TRAF2/cIAP-1 e -2 permitindo a ativação de NF-κB, de modo que a interação entre TRAF2 e TNFR1 inibe a habilidade deste receptor induzir a apoptose (FOTIN-MLECZEK et al, 2002). Portanto, aumento na expressão de *TRAF2* corrobora o prejuízo na via apoptótica. Além disto, o complexo de sinalização indutor de morte (DISC ou complexo II) formado a partir da dissociação entre TNFR1 e TRADD, com posterior recrutamento de FADD e procaspase-8 (MICHEAU; TSCHOPP, 2003; HEHLGANS; PFEFFER, 2005), tem sua atividade inibida por cFLIP (MICHEAU; TSCHOPP, 2003; IRMLER et al., 1997). Nas amostras de câncer gástrico, a expressão aumentada de *CFLIP* indica prejuízo na ativação da caspase-8, que embora apresentasse expressão elevada, não era convertida para a forma ativa, dessa forma bloqueando a sinalização apoptótica, em adição a expressão reduzida da caspase-3 efetora (*CASP3).*

A partir destes resultados, o efeito da redução na expressão dos receptores TNFR1 e TNFR2 em linhagem AGS de câncer gástrico foi avaliado. Após

silenciamento parcial de TNFR1, constatamos expressão significantemente reduzida de *TNFA, NFKB1* e *NFKB2* e aumento de *CASP3* em relação a linhagem não silenciada, embora não foi observada alteração na taxa de células apoptóticas e no ciclo celular. Esses achados mostram que a redução de cerca de 60% na expressão de TNFR1 foi capaz de reduzir a expressão de genes da via de sobrevivência celular, assim como aumentar a expressão do gene pró-apoptótico CASP3. Contudo, não foi suficiente para resultar em aumento da apoptose, provavelmente, devido também a redução na expressão do ligante (TNF-α), o que prejudica a ativação da via de sinalização tanto mediada por TNFR1 como TNFR2. Estudos apontam que TNFR1 ativa mais eficientemente o fator de transcrição NF-κB que TNFR2, e este fator regula a expressão de *TNFA* por um mecanismo de *feedback* positivo autócrino (COWARD et al., 2002, VERMA et al., 2009; WU; ZHOU, 2010). Portanto, a redução na expressão de ambos *NFKB1* e *NFKB2* observada na linhagem AGS-shR1 influenciou negativamente a expressão do ligante. Em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos, pesquisadores (ZHANG; XIAO, 2017) observaram maior inibição na expressão de TNF-α após silenciamento de TNFR1 comparado com silenciamento de TNFR2, assim como observado em nosso estudo.

Conforme resultados obtidos nas amostras de câncer gástrico, esperavamos que redução na expressão de TNFR2 e consequente predomínio da via mediada por TNFR1 resultaria em aumento na apoptose e redução na proliferação celular. No entanto, silenciamento parcial de TNFR2 reduziu significantemente a expressão de *TRAF2* e *TRADD,* mediadores importantes para a formação do complexo DISC de morte celular, assim resultando em redução na apoptose inicial e parada do ciclo celular na fase G2/M. Em um modelo de hepatite induzida, ratos *knockout* para TRADD foram resistentes a toxicidade induzida por TNFR1, demonstrando que este mediador é fundamental para a sinalização resultante da ligação TNF-α/TNFR1 (ERMOLAEVA et al., 2008). Por outro lado, esta via não foi completamente prejudicada em macrófagos desprovidos de TRADD, indicando que a dependência da proteína adaptadora TRADD na transdução de sinal intracelular desencadeada por TNFR1 parece depender do tipo celular (POBEZINSKAYA et al., 2008; POBEZINSKAYA; LIU, 2012). Nossos resultados reforçam a participação de TRADD para desencadear o processo de apoptose mediada por TNF-α.

Por outro lado, embora necessário para ativação da apoptose, redução na expressão de TRADD parece não influenciar a ativação de NF-κB, uma vez que

silenciamento parcial de TNFR2 não afetou a expressão de *NFKB1* e *NFKB2,* que pode ter sido conduzida pela via de TNFR1 independente de TRADD. Em geral, após a ligação com TNFR1, TRADD recruta RIP1 e TRAF2 para formar o complexo I e ativar NF-κB (Figura 5 em ROSSI et al., 2019). Ligação TNFR1/TRAF2 é perdida na ausência de TRADD, enquanto RIP1 é capaz de se conectar diretamente com o receptor (CHEN et al., 2008). Uma vez poliubiquitinado, RIP1 pode ativar NF-κB (NAUDÉ et al., 2011) e, com isto, a sinalização pró-sobrevivência mediada por TNFR1 independente de TRADD, como observado na linhagem celular AGS-shR2.

Silenciamento parcial de TNFR2 também resultou em redução na expressão de TRAF2, um mediador que possui papel essencial na transdução de sinal desencadeada por TNF-α, sendo recrutado tanto por TNFR1 quanto por TNFR2 (WAJANT; HENKLER; SCHEURICH, 2001). Além deste, os receptores também compartilham outras proteínas de sinalização intracelular mostrando a existência de uma "relação cruzada" entre eles na ativação das vias de sobrevivência e morte celular (NAUDÉ et al., 2011). Alguns estudos demonstraram que perda da expressão de TNFR2 leva a resistência a citotoxicidade mediada por TNF-α por influenciar na expressão de TRAF2, uma vez que esta proteína está envolvida na ocorrência de apoptose estimulada pela cooperação entre os receptores (MEAGER et al., 1993; DECLERCQ et al., 1998). Portanto, nossos resultados sugerem que silenciamento parcial de TNFR2 reduz significantemente as taxas de apoptose inicial na linhagem AGS-shR2 pela redução na expressão de TRADD e TRAF2, prejudicando a via de apoptose mediada por TNFR1.

Outra consequência do silenciamento de TNFR2 foi o aumento significante de células bloqueadas na fase G2/M do ciclo celular e redução em G0/G1. Considerando que não houve alteração significativa na proliferação celular pelo ensaio MTT, estes dados sugerem parada do ciclo celular na fase G2/M, o que pode estar relacionado com danos no DNA (DIPAOLA, 2002). Recentes estudos (AFZAL et al., 2019; MANOEL-CAETANO et al., 2019) mostraram aumento na expressão de genes relacionados a resposta ao dano no DNA e reparo, como *APE1, H2AX* e *PARP-1* em amostras de câncer gástrico como um mecanismo de sobrevivência de células tumorais (MANOEL-CAETANO et al., 2019). Yang e colaboradores (2017) demonstraram que TNFR2 aumenta o reparo de danos no DNA por meio da regulação da expressão de PARP em células de câncer de mama. Além disto, mostraram que o silenciamento de TNFR2 levou a aumento em pH2AX, um

marcador de presença de quebras duplas no DNA. No presente estudo, bloqueio na fase G2/M do ciclo celular após o silenciamento de TNFR2 sugere uma diminuição nos mecanismos de reparo de danos no DNA, o que pode ser um importante mecanismo antitumoral.

Em conjunto, nossos resultados destacam o importante papel da via de sinalização de TNF-α mediada tanto por TNFR2 (ROSSI et al., 2019) como por TNFR1 em câncer gástrico. No tecido tumoral, aumento na expressão de TNFR2 e redução de TNFR1 ocorreu simultaneamente com o predomínio da expressão de mediadores pró-sobrevivência em relação aos pró-apoptóticos. Na linhagem celular AGS, silenciamento parcial de TNFR1 reduziu a expressão de importantes genes da via de sobrevivência celular, afetando também a expressão de TNF-α, apesar de não terem sido observadas mudanças nos processos celulares, enquanto inibição de TNFR2 prejudicou a transdução de sinal intracelular mediada por TNFR1 devido a regulação negativa de TRADD e TRAF2, o que levou a diminuição na apoptose e favorecimento da sobrevivência celular, dessa forma ressaltando a existência de uma “relação cruzada” entre estes receptores. Além disto, parada do ciclo celular em G2/M após redução na expressão de TNFR2 indica um mecanismo antitumoral. Entretanto, deve-se considerar que TNF-α e seus receptores são expressos também por células presentes no ambiente tumoral, como as células imunes (WU; ZHOU, 2010). Oshima e colaboradores (2014) demonstraram que a estimulação da sinalização de TNF-α mediada por TNFR1 em células do microambiente tumoral promove a tumorigênese gástrica por meio da indução dos fatores promotores de tumor *Noxo1* e *Gna14* em células epiteliais tumorais, descatando a importância do microambiente tumoral e a necessidade de mais estudos.

Considerando a importância dos miRNAs para o desenvolvimento de doenças inflamatórias e câncer, a partir de pesquisa em bancos de dados públicos selecionamos os miRNAs miR-19a, miR-34a, miR-103a, miR-130a e miR-191c, que apresentam como alvos preditos ou validados genes da via de sinalização de TNF-α. De modo geral, com exceção do miR-34a que apresentou expressão elevada, os miRNAs avaliados não estavam desregulados nas amostras de câncer gástrico. Interessantemente, nos estudos *in vitro* em linhagem AGS, redução na expressão de TNFR2 causou aumento na expressão do miR-34a e também do miR-19a, enquanto silenciamento parcial de TNFR1 não afetou a expressão desses miRNAs. Além destas análises, utilizamos dados de bioinformática e análise *in silico* para construir

uma rede de interação miRNA:RNAm, demonstrando inúmeras relações entre esses miRNAs e genes da via de sinalização de TNF-α (Figura 4 em ROSSI et al., 2019).

Vários estudos destacaram o papel supressor-tumoral do miR-34a, pois expressão reduzida foi associada com estágio clínico avançado, metástase de linfonodo (YANG et al., 2016), menor taxa de sobrevida (ZHOU et al., 2018) e maior taxa de recorrência (ZHANG et al., 2015) em pacientes com câncer gástrico. Entretanto, nossos resultados nas amostras de câncer gástrico demonstram uma ação oncogênica deste miRNA, corroborando estudos que apontam um aumento significante na sua expressão associado com menor sobrevivência global no câncer gástrico (OSAWA et al., 2011). Além disto, nosso estudo indica que a expressão do miR-34a é influenciada pela via de sinalização de TNF-α mediada por TNFR2, uma vez que redução de cerca de 60% na expressão de TNFR2 aumentou em quase três vezes a expressão deste miRNA. Portanto, destaca o seu envolvimento no câncer gástrico, o que merece mais estudos para compreender o papel deste miRNA e sua relação na sinalização de TNF-α.

De modo contrário, o miR-19a possui função principalmente oncogênica e redução na sua expressão resulta em supressão da proliferação, migração e invasão em câncer gástrico (ZHU et al., 2019). Embora não tenha apresentado alteração na expressão em amostras de câncer gástrico, silenciamento parcial de TNFR2 resultou em aumento na expressão do miR-19a na linhagem AGS. A rede de interação apresentada na Figura 4 (ROSSI et al., 2019) mostra que o miR-19a-3p tem como alvos validados os RNAm de *TNFA, TNFR1* e *TNFR2*. Nossos resultados reforçam TNFR2 como alvo de miR-19a em câncer gástrico, mas estudos de validação ainda precisam ser realizados. Além disto, miR-19a influencia negativamente a apoptose (ZHAO et al., 2017) e, assim, aumento na expressão deste miRNA pode também ter contribuído para a redução na taxa de apoptose inicial observada na linhagem silenciada para TNFR2.

Os outros miRNAs avaliados (miR-103a, miR-130a e miR-181c) não foram desregulados nem no tecido tumoral, nem nos experimentos com linhagem celular de câncer gástrico. Embora recentes estudos sugerem ação destes miRNAs nesta neoplasia (CUI et al.; 2013, LIANG et al., 2015; ZHOU et al., 2017; HU et al., 2018; WANG et al., 2018a; ZABAGLIA et al., 2018), seus papéis como pró ou antitumoral são ainda controversos. Isto pode ser devido a influência de vários fatores na regulação da expressão de genes por miRNAs como, por exemplo, agentes

infecciosos (ROSSI et al., 2016), metilação do DNA (WANG; WU; CLARET, 2017), além de distintos estágios da carcinogênese e subtipo tumoral. Quando estratificamos as amostras de câncer gástrico por tipo histológico, expressão significantemente aumentada dos miR-103a e miR-130a foi observada no tipo difuso em relação ao tipo intestinal. Embora esta relação ainda não tivesse sido demonstrada para o miR-130a, o miR-103a já foi descrito como um biomarcador de alta sensibilidade e especificidade para o tipo difuso (ROTKRUA et al., 2013). Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (ROSSI et al., 2016), miR-103a e miR-181c apresentaram expressão aumentada em amostras de gastrite crônica após tratamento de erradicação da bactéria *H. pylori,* e foram inversamente correlacionados com a expressão de TNF-α, sugerindo que estes miRNAs podem influenciar etapas iniciais da carcinogênese gástrica no contexto de infecção pela *H. pylori.*

Outro fator importante na carcinogênese gástrica é a infecção pela *H. pylori,* bactéria capaz de desregular a expressão de vários genes e miRNAs conforme investigado previamente por nosso grupo de pesquisa (CADAMURO et al., 2015; ROSSI et al., 2016). Embora a expressão dos genes e miRNAs avaliados no presente estudo não apresentou associação com a infecção pela *H. pylori* nas amostras de câncer gástrico, tratamento da linhagem AGS não silenciada com extrato da *H. pylori* resultou em aumento na expressão de genes da via pró-sobrevivência e inflamatória como *TNFR1, NFKB1, NFKB2* e *CFLIP*, e redução na expressão de *TNFR2.* Ambas as linhagens silenciadas AGS-shR1 e AGS-shR2, também exibiram aumento na expressão de *CFLIP, NFKB2* e/ou *NFKB1* após tratamento com eHP, embora este aumento foi mais acentuado na linhagem não silenciada. Além disto, tratamento com eHP na linhagem silenciada para TNFR1 resultou em significante redução na expressão de *CASP8.* A falta de associação da infecção pela *H. pylori* nas amostras de câncer gástrico, que apresentaram um predomínio da via de sinalização de TNF-α mediada por TNFR2, juntamente com os resultados obtidos nos experimentos *in vitro* com linhagem AGS*,* sugere que a resposta da infecção por esta bactéria nesta via de sinalização é mediada principalmente por TNFR1 em câncer gástrico direcionando a transdução de sinal para a via de sobrevivência celular e pró-inflamatória, devido a aumento na expressão de *NFKB1, NFKB2* e *CFLIP.* Em concordância, Maeda e colaboradores (2000) demonstraram que a ativação de NF-κB pela *H. pylori* depende do número de

células bacterianas e resulta na indução da transcrição de genes anti-apoptóticos (MICHEAU et al. 2001). Estes resultados são reforçados pelo nosso estudo prévio em pacientes com gastrite crônica com infecção pela *H. pylori,* em que observamos expressão elevada de mediadores de inflamação como TNF-α, *IL6, IL12A* and *IL2* (ROSSI et al., 2016), além dos receptores *TLR2* e *TLR4* (CADAMURO et al., 2015), *IL-8, TGF-β, REG3A* e *IFITM1* (dados ainda não publicados – CADAMURO, 2014), cujos níveis de expressão, de modo geral, foram reduzidos após tratamento de erradicação da bactéria.

Adicionalmente, investigamos o efeito do tratamento com extrato da *H. pylori* nas linhagens AGS silenciadas e não silenciada em processos celulares, e observamos que o tratamento aumentou a taxa de necrose tanto na linhagem não silenciada como na linhagem com silenciamento de TNFR1. Wan e colaboradores (2016) mostraram que a co-cultura da linhagem AGS com *H. pylori* inibe a apoptose e aumenta a viabilidade por causar aumento na expressão de TRAF1 desencadeado pela ativação de NF-κB. Entretanto, o pico máximo da expressão de TRAF1 ocorreu após 12 horas da infecção e seu efeito na viabilidade celular iniciou apenas após 24 horas. Portanto, o tempo de tratamento da cultura e a concentração de eHP devem ser fatores importantes, uma vez que em 6 horas de tratamento e concentração de 30% v/v, como usado no presente estudo, não houve alteração no ciclo celular e apoptose na linhagem AGS não silenciada. Contudo, tratamento com eHP nas linhagens não silenciada e silenciada para TNFR1 promoveu um aumento significante da porcentagem de células em necrose. Embora o papel da necrose em câncer é ainda muito discutido (MENG et al., 2016; PHILIPP; SOSNA; ADAM, 2016; NAJAFOV; CHEN; YUAN, 2017), é consenso que a sinalização de TNF-α pode induzir necrose ativada pelos níveis elevados de cFLIP (BRENNER; BLASER; MAK, 2015) e por depleção de Caspase-8 (MENG et al., 2016), condições observadas no presente estudo após tratamento com eHP. No entanto, a influência da necrose em células de câncer gástrico e no microambiente tumoral deve ser investigado.

Portanto, o presente estudo mostrou que a via de sinalização de TNF-α está desregulada em amostras de câncer gástrico e que o silenciamento dos receptores TNFR1 e TNFR2 foi capaz de reduzir a expressão de genes pró-sobrevivência e anti-apoptóticos, assim como afetar a apoptose, a distribuição de células no ciclo celular e a expressão de miRNAs. Com isto, a inibição conjunta dos dois receptores

pode ter um efeito antitumoral em câncer gástrico, sendo necessária a realização de estudos *in vivo.*

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em amostras de tecido e células tumorais gástricas AGS, nas condições propostas, permitem concluir que:

a – Câncer gástrico associa-se com predomínio na expressão de genes pró-sobrevivência e do miRNA hsa-miR-34a-3p em relação aos genes pró-apoptóticos, resultante da ativação da via de sinalização de TNF-α mediada por TNFR2.

b – Há várias interrelações entre os miRNAs avaliados e genes da via de sinalização de TNF-α, destacando os miRNAs hsa-miR-19a-3p e hsa-miR-103a-3p e os *TNFA, TNFR1, TNFR2, CFLIP, TRADD, CASP3* e *CASP8.*

c – Silenciamento parcial do receptor TNFR1 reduz a expressão de genes pró-sobrevivência e aumenta a expressão do gene pró-apoptótico *CASP3,* mas não afeta processos celulares.

d – Silencimento parcial do receptor TNFR2 reduz a apoptote por prejudicar a via de sinalização apoptótica mediada por TNFR1 por meio de *TRADD* e *TRAF2*, além de promover parada na fase G2/M do ciclo celular.

d – A expressão dos miRNAs hsa-miR-19a-3p e hsa-miR-34a-3p relacionam-se com genes da via de sinalização de TNF-α influenciados pela expressão de TNFR2.

e – *H. pylori* associa-se com aumento da expressão de *TNFR1, NFKB1, NFKB2* e *CFLIP* e redução de *TNFR2*. Portanto, esta bactéria deve ativar a via de sobrevivência celular de TNF-α mediada principalmente por TNFR1.

REFERÊNCIAS

ACUNZO, M. et al. MicroRNA and cancer – A brief overview. **Adv Biol Regul,** v. 57, p. 1-9, 2015.

AFZAL, H. et al. PARP1: A potential biomarker for gastric cancer. **Pathol Res Pract,** 2019. [Epub ahead of print] DOI: 10.1016/j.prp.2019.152472

AGARWAL, V. et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **Elife,** v.4, 2015.

ALESSANDRINI, L. et al. Proposed Molecular and miRNA Classification of Gastric Cancer. **Int J Mol Sci,** v.19, n.6, p. 1-20, 2018.

ALFAROUK, K.O. et al. The Possible Role of *Helicobacter pylori* in Gastric Cancer and Its Management. **Front Oncol,** v.9, p.1-12, 2019.

AL-LAMKI, R.S. et al. Tumor necrosis factor receptor expression and signaling in renal cell carcinoma. **Am J Pathol,** v.177, p. 943-954, 2010.

BABIARZ, J.E. et al. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. **Genes Dev,** v.22, n.20, p.2773-2785, 2008.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer,** v.9, n.5, p.361-371, 2009.

BARBER, M. et al. Mechanisms and sequelae of E-cadherin silencing in hereditary diffuse gastric cancer. **J Pathol,** v.216, p.295-306, 2008.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell,** v.136, n.2, p.215-233, 2009.

BEILHARZ, T.H. et al. microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. **PloS One,** v.4: e6783, 2009.

BETEL, D. et al. The microRNA.org resource: targets and expression. **Nucleic Acids Res.,** v.36 (Database issue), p. D149-153, 2008.

BLACK, R.A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature,** v.385, p.729-733, 1997.

BOYERINAS, B. et al. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. **Endocr Relat Cancer,** v.17, n.1, p.F19-36, 2010.

BRENNER, D.; BLASER, H.; MAK, T.W. Regulation of tumour necrosis factor signaling: live or let die. **Nat Rev Immunol,** v.15, n.6, p. 362-374, 2015.

CABAL-HIERRO, L. et al. TRAF-mediated modulation of NF-kB AND JNK Activation by TNFR2. **Cell Signal,** v.26, p.2658-2666, 2014.

CADAMURO, A.C. et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on TLR2 and TLR4 expression in patients with gastric lesions. **Mediators Inflamm,** v.2015, article ID 481972, p. 1-9, 2015.

CADAMURO, A.C.T. et al. *Helicobacter pylori* infection: Host immune response, implications on gene expression and microRNAs. **World J Gastroenterol,** v.20, p.1424-1437, 2014.

CADAMURO, A.C.T. Expressão gênica e protéica e cinética celular no processo inflamatório induzido pela *Helicobacter pylori* antes e após terapia de erradicação. 2014. 177f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2014.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature,** v.513, p.7517, p. 202-209, 2014.

CHANG, W.L.; YEH, Y.C.; SHEU, B.S. The impacts of *H. pylori* virulence factors on the development of gastroduodenal diseases. **J Biomed Sci,** v.25, n.1, p.1-9, 2018.

CHEN, N.J. et al. Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. **Proc Natl Acad Sci USA,** v.105, n.34, p. 12429-12434, 2008.

CHENDRIMADA, T.P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature,** v.436, n.7051, p. 740-744, 2005.

CHIBA, T.; MARUSAWA, H.; USHIJIMA, T. Inflammation-Associated Cancer Development in Digestive Organs: Mechanisms and Roles for Genetic and Epigenetic Modulation. **Gastroenterol,** v. 143, p. 550-563**,** 2012.

CHOU, C.H. et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. **Nucleic Acids Res,** v.44, n.D1, p. D239-247, 2016.

CORREA, P. et al. A model for gastric cancer epidemiology. **Lancet,** v.2, p. 58-60, 1975.

COWARD, W.R. et al. NF-kappa B and TNF-alpha: a positive autocrine loop in human lung mast cells? *J Immunol*, v. 169, p. 5287-5293, 2002.

CUI, M. et al. Association of microRNA-181c expression with the progression and prognosis of human gastric carcinoma. **Hepatogastroenterology,** v.60, p.961-964, 2013.

DECLERCQ, W. et al. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. **J Immunol,** v.161, n.1, p.390-399, 1998.

DENG, X. et al. MicroRNA-34a regulates proliferation and apoptosis of gastric cancer cells by targeting silent information regulator 1. **Exp Ther Med,** v.15, n.4, p. 3705-3714, 2018.

De RIE, D. et al. Na integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. **Nat Biotechnol,** v.35, n.9, p.872-878, 2017.

DWEEP, H.; GRETZ, N. miRWalk 2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. **Nat Methods,** v.12, n.8:697, 2015.

DÍAZ, P. et al. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Adaptative Cellular Mechanisms Involved in disease Progression. **Front Microbiol,** v.9, p. 1-10, 2018.

DIEDERICHS, S.; HABER, D.A. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. **Cell,** v.131, n. 6, p. 1097-1108, 2007.

DiPAOLA, R.S. To Arrest or Not To G2-M Cell-Cycle Arrest. **Clin Cancer Res**, v.8, p.3311-3314, 2002.

ECHIZEN, K. et al. The inflammatory microenvironment that promotes gastrointestinal cancer development and invasion. **Adv Biol Regul,** v.68, p.39-45, 2018.

ELBASHIR, S.M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. **Genes Dev,** v.15, p.188-200, 2001a.

ELBASHIR, S.M. et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. **EMBO J,** v.20, p.6877-6888, 2001b.

ERMOLAEVA, M.A. et al. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory response. **Nat Immunol,** v.9, n.9, p. 1037-1046, 2008.

ESLAMI, M. et al. Current information on the association of *Helicobacter pylori* with autophagy and gastric cancer. **J Cell Physiol,** v.234, p.14800-14811, 2019.

FAUSTMAN, D.L.; DAVIS, M. TNF receptor 2 and disease: autoimmunity and regenerative medicine. **Front Immunol,** v.4, p.478, 2013.

FOTIN-MLECZEK, M. et al. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. **J Cell Sci,** v.115, n. Pt13, p. 2757-2770, 2002.

GLOBOCAN: The Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer [Internet], 2018. Cancer Today fact Sheets. Disponível em:

http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/7-Stomach-fact-sheet.pdf (Acesso em 10.07.2019).

GOLL, R. et al. *Helicobacter pylori* stimulates a mixed adaptative immune response with a strong T-regulatory component in human gastric mucosa. Helicobacter, v.12, p.185-92, 2007.

GU, S. et al. The biological basis for microRNA target restriction to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. **Nat Struct Mol Biol,** v.16, p.144-150, 2009.

GUENNEWIG, B. et al. Synthetic pre-microRNAs reveal dual-strand activity of miR-34a on TNF-α. **RNA,** v.20, n.1, p.61-75, 2014.

HAM, B. et al. The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis. **Trends Cancer Res,** v.11, n.1, p.1-27, 2016.

HASHIMOTO, Y. et al. Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis. **Carcinogenesis,** v.31, p.777-784, 2010.

HAUWERMEIREN, V.; VANDERNBROUCKE, R.E.; LEBERT, C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. **Cytokine Growth Factor Rev,** v.22, n.5-6, p.311-219, 2011.

HAYES, J.; PERUZZI, P.P.; LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. **Trends Mol Med,** v.20, n.8, p. 460-469, 2014.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology,** v.115, p. 1-20, 2005.

HENRY, V.J. et al. OMICtools: an informative directory for multi-omic data analysis. **Database (Oxford),** v.2014, 2014.

HU, X. et al. miRNA-103a-3p promotes human gastric cancer proliferation by targeting and suppressing ATF7 *in vitro.* **Mol Cells,** v.41, n.5, p.390-400, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva (INCA). Ministério da Saúde. Estimativa 2018 - Incidência de câncer no Brasil. 2018. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf (Acesso em 10.07.2019).

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Biological agents, IARC monographs, vol. 100B. Lyon: IARC; 2012.

IORIO, M.V.; CROCE, C.M. microRNA involvement in human cancer. **Carcinogenesis,** v.33, n.6, p.1126-1133, 2012.

IRMLER, M. et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. **Nature,** v.388, n.6638, p. 190-195, 1997.

ISHIMOTO, T. et al. Current perspectives toward the identification of key players in gastric cancer microRNA dysregulation. **Int J Cancer,** v.138, n.6, p. 1337-1349, 2016.

ISOMOTO, H. et al. Interweaving MicroRNAs and Proinflammatory Cytokines in Gastric Mucosa with Reference to *H. pylori* Infection. **J Clin Immunol**, v. 32, p. 290-299, 2012.

JING, Y. et al. Tumor necrosis factor-α promotes hepatocellular carcinogenesis through the activation of hepatic progenitor cells. **Cancer Lett,** v.434, p.22-32, 2018.

JO, M.H. et al. Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. **Mol Cell,** v.59, n.1, p.117-124, 2015.

JONES, E.Y.; STUART, D.I.; WALKER, N.P. Structure of tumour necrosis factor. **Nature,** v.338, p.225-228, 1989.

JOSEPHS, S.F. et al. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. **J Transl Med,** v.16, n.1, p.1-8, 2018.

KALALI, B. et al. *H. pylori* Virulence Factors: Influence on Immune System and Pathology, v.2014, p.1-9, 2014.

KOBAYASHI, H.; TOMARI, Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. **Biochim Biophys Acta.,** v.1859, n.1, p.71-81, 2016.

LANDSKRON, G. et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **J Immunol Res,** v.2014, article ID 149185, p. 1-19, 2014.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 64, p. 31-49, 1965.

LEE, Y. et al. The nuclear Rnase II Drosha initiates microRNA processing. **Nature,** v.425, p.45-419, 2003.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J,** v.23, p.4051-4060, 2004.

LEONARD, B.C.; JOHNSON, D.E. Signaling by cell surgace death receptors: Alterations in head and neck cancer. **Adv Biol Regul,** v.67, p.170-178, 2018.

LEWIS, B.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell,** v.120, p.15-20, 2005.

LI, S-C.; PAN, C-Y.; LIN, W-C. Bioinformatic discovery of microRNA precursors from human ESTs and introns. **BMC Genomics,** v.7: 164, 2006.

LIANG, J. et al. MicroRNA-103a inhibits gastric cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting c-Myb. **Cell Prolif,** v.48, n.1, p.78-85, 2015.

LIU, X.; MELTZER, S.J. Gastric Cancer in the Era of Precision Medicine. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol,** v.3, n.3, p. 348-358, 2017.

LOTT, P.C.; CARVAJAL-CARMONA, L.G. Resolving gastric cancer aetiology: an update in genetic predisposition. **Lancet Gastroenterol Hepatol,** v.3, n.12, p. 874-883, 2018.

LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v.435, p.834-838, 2005.

MAEDA, S. et al. *H. pylori* activates NF-kappaB through a signaling pathway involving IkappaB kinases, NF-kappaB–inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells. **Gastroenterology**, v. 119, p. 97-108, 2000.

MANOEL-CAETANO, F.S. et al. Upregulation of the *APE1* and *H2AX* genes and miRNAs involved in DNA damage response and repair in gastric cancer. **Genes Dis,** v.6, n.2, p.176-184, 2019.

MANSOORI, B. SHOTORBANI, S.S.; BARADARAN, B. RNa interference and its role in cancer therapy. **Adv Pharm Bull,** v.4, n.4, p.313-321, 2014.

MATSUSHIMA, K. et al. MicroRNA signatures in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. **Int J Cancer,** v. 128, p.361-370, 2011.

McLEAN, M.H.; EL-OMAR, E. M. Genetics of gastric cancer. **Nat Ver Gastroenterol Hepatol,** v. 11, n.11, p. 664-674, 2014.

MEAGER, A. et al. Development of resistance to tumour necrosis factor (TNF alpha) in KYM-1 cells involves both TNF receptors. **Cytokine,** v.5, n.6, p.556-563, 1993.

MENG, M.B. et al. Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. **Oncotarget,** v.7, n.35, p.57391-57413, 2016.

MICHEAU, O. et al. NF-kappa B signals induce the expression of c-FLIP. **Mol Cell Biol,** v.21, n.16, p.5299-5305, 2001.

MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell**, v.114, p.181-190, 2003.

MIRANDA, K.C. et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. **Cell,** v.126, n.5, p. 1203-1217, 2006.

miRBase: the microRNA database. Release 22.1. Outubro de 2018. Disponível em: <www.mirbase.org>

MULRANE, L. et al. miRNA dysregulation in breast cancer. **Cancer Res,** v.73, n.22, p.6554-6562, 2013.

MURATA, M. Inflammation and Cancer. **Environ Health Prev Med,** v.23, n.1, p.1-8, 2018.

NAGANO, T. et al. Novel Cancer therapy targeting microbiome. **Onco Targets Ther,** v.12, p. 3619-3624, 2019.

NAJAFOV, A.; CHEN, H.; YUAN, J. Necroptosis and Cancer. **Trends Cancer,** v.3, n.4, p.294-301, 2017.

NAUDÉ, P.J. et al. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. **FEBS J,** v.278, n.6, p.888-898, 2011.

NECULA, L. et al. Recent advances in gastric cancer early diagnosis. **World J Gastroenterol,** v.25, n.17, p. 2029-2044, 2019.

O'BRIEN, J. et al. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Front Endocrinol (Lausanne),** 9:402, 2018.

OKADA, C. et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. **Science,** v.326, n.5957, p.1275-1279, 2009.

OSAWA, S. et al. MicroRNA profiling of gastric cancer patients from formalin-fixed paraffin-embedded samples. **Oncol Lett,** v.2, n.4, p.613-619, 2011.

OSHIMA, H. et al. TNF-α/TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of *Noxo1* and *Gna14* in tumor cells. Oncogene, v.33, p.3820-3829, 2014.

OUE, N. et al. Molecular carcinogenesis of gastric cancer: Lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells. **Int J Clin Oncol,** v.24, n.7, p. 771-778, 2019.

PENTHEROUDAKIS, G. et al. Novel microRNA-based assay demonstrates 92% agreement with diagnosis based on clinicopathologic and management data in a cohort of patients with carcinoma of unknown primary. **Mol Cancer,** v.12, p.1-8, 2013.

PHILIPP, S.; SOSNA, J.; ADAM, D. Cancer and necroptosis: friend or foe? **Cell Mol Life Sci,** v.73, n.11-12, p.2183-2193, 2016.

POBEZINSKAYA, Y.L. et al. The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. **Nat Immunol,** v.9, n.9, p.1047-1054, 2008.

POBEZINSKAYA, Y.L.; LIU, Z. The role of TRADD in death receptor signaling. **Cell Cycle,** v.11, n.5, p.871-876, 2012.

POLAKOVICOVA, I. et al. Role of microRNAs and Exosomes in *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr Virus Associated Gastric Cancer. **Front Microbiol,** v.9, p.1-16, 2018.

PORTUGAL, Sandra. Início > Frases > “O sucesso nasce do quere, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”. **Projetando Pessoas,** 30 de jun. de 2014, Disponível em: < https://projetandopessoas.com.br/frases/o-sucesso-nasce-querer-da-determinacao-e-persistencia-em-se-chegar-um-objetivo-mesmo-nao-atingindo-o-alvo-quem-busca-e-vence-obstaculos-minimo-fara-coisas-admiraveis/?doing_wp_cron=1565613715.4271790981292724609375>. Acesso em: 12 de ago. de 2019.

QU, Y.; ZHAO, G.; LI, H. Forward and Reverse Signaling Mediated by Transmembrane Tumor Necrosis Factor-Alpha and TNF Receptor 2: Potential Roles in an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. **Front Immunol,** v.8, p.1-7, 2017.

RIQUELME, I. et al. Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway-driven targeted therapy. **Oncotarget,** v.6, n.28, p. 24750-24779, 2015.

RIVAS-ORTIZ, C. I. et al. Genetic Alterations in Gastric Cancer Associated with *Helicobacter pylori* Infection. **Front Med (Lausanne),** v.2:47, p.1-12, 2017.

RODEN, C. et al. Novel determinants of mammalian primary microRNA processing revealed by systematic evaluation of hairpin-containing transcripts and human genetic variation. **Genome Res,** v.27, n.3, p.374-384, 2017.

RODRÍGUEZ, M. et al. NF-kappaB signal Triggering and termination by tumor necrosis factor receptor 2. **J Biol Chen,** v.286, n.26, p.22814-22824, 2011.

ROSSI, A.F.T. et al. Interaction between inflammatory mediators and miRNAs in *Helicobacter pylori* infection. **Cell Microbiol,** v.18, n.10, p.1444-1458, 2016.

ROSSI, A.F.T. et al. Up-regulation of tumor necrosis factor-α pathway survival genes and of the receptor TNFR2 in gastric cancer. **World J Gastrointest Oncol,** v.11, n.4, p.281-294, 2019.

ROTHE, M. et al. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. **Science,** v.269, p.1424-1427, 1995.

ROTKRUA, P. et al. Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using mouse model. **Br J Cancer,** v.108, p.932-940, 2013.

SALAMA, N.R.; HARTUNG, M.L.; MÜLLER, A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori.* **Nat Rev Microbiol,** v. 11, p. 385-399, 2013.

SETHI, G.; SUNG, B.; AGGARWAL, B.B. TNF: a master switch for inflammation to cancer. **Front Biosci,** v.13, p. 5094-5107, 2008.

SONG, J.H.; MELTZER, S.J. MicroRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of gastroesophageal cancers. **Gastroenterology,** v.143, n.1, p. 35-47, 2012.

TREIBER, T.; TREIBER, N.; MEISTER, G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v.20, n.1, p.5-20, 2019.

VEJNAR, C.E.; BLUM, M.; ZDOBNOV, E.M. miRmap web: Comprehensive microRNA target prediction online. **Nucleic Acids Res.,** v.41 (Web Server issue), p. W165-168, 2013.

VERMA, N. et al. Silencing of TNF-alpha receptors coordinately suppresses TNFalpha expression through NF-kappaB activation blockade in THP-1 macrophage. **FEBS Lett**, v. 583, p. 2968-2974, 2009.

VLACHOS, I.S. et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. **Nucleic Acids Res.,** v.43 (Database issue), p. D153-9, 2015.

WAJANT, H.; HENKLER, F.; SCHEURICH, P. The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. **Cell Signal,** v.13, n.6, p. 389-400, 2001.

WAJANT, H.; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF-kB pathway. **FEBS J,** v. 278, n.6, p. 862-876, 2011.
WAN, X.K. et al. *Helicobacter pylori* inhibits the cleavage of TRAF1 via a CagA-dependent mechanism. **World J Gastroenterol,** v.22, n.48, p.10566-10574, 2016.

WANG, C.Y. et al. NF-kappa B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. **Science,** v.281, n.5383, p. 1680-1630, 1998.

WANG, F. et al. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. **Cancer Lett,** v.345, n.2, p.196-202, 2014.

WANG, S.; WU. W.; CLARET, F.X. Mutual regulation of microRNAs and DNA methylation in human cancers. **Epigenetics,** v.12, p. 187-197, 2017.

WANG, X. Improving microRNA target prediction by modeling with unambiguously identified microRNA target pairs from CLIP-ligation studies. **Bioinformatics,** v.32, p.1316-1322, 2016.

WANG, S. et al. MicroRNA-130a-3p suppresses cell migration and invasion by inhibition of TBL1XR1-mediated EMT in human gastric carcinoma. **Mol Carcinog,** v.57, n.3, p. 383-392, 2018a.

WANG, B. et al. miR-34a directly targets $tRNA_i^{Met}$ precursors and affects cellular proliferation, cell cycle, and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA,** v.115, n.28, p.7392-7397, 2018b.

WONG, N.; WANG, X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. **Nucleic Acids Res***,* v. 43, p. D146-D152, 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.639-644, 2010.

WU, W-Y. et al. Potentially predictive microRNAs of gastric cancer with metastasis to lymph node. **World J Gastroenterol,** v. 17, p.3645-3651, 2011.

XIE, M. et al. Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. **Cell,** v.155, n.7, p.1568-1580, 2013.

YANG, B. et al. miR-335 directly, while miR-34a indirectly modulate surviving expression and regulate growth, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells. **Tumour Biol,** v.37, n.2, p.1771-1779, 2016.

YANG, F.; ZHAO, N.; WU, N. TNFR2 promotes Adriamycin resistance in breast cancer cells by repairing DNA damage. **Mol Med Rep,** v.16, n.3, p. 2962-2968, 2017.

YANG, J.S. et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA,** v.107, n.34, p.15163-15168, 2010.

YANG, S. et al. Role of TNF-TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. **Front Immunol,** v.9, p.1-11, 2018a.

YANG, F. et al. NF-kB/miR-223-3p/ARID1A axis is involved in *Helicobacter pylori* CagA-induced gastric carcinogenesis and progression. **Cell Death Dis,** v.9, n.1, 2018b.

YI, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev,** v.17, p.3011-3016, 2003.

YOUSEFI, B. et al. Epigenetic changes in gastric cancer induction by *Helicobacter pylori.* **J Cell Physiol,** p.1-15, 2019.

YU, Y. et al. TNF-α receptor 1 knockdown in the subfornical organ ameliorates sympathetic excitation and cardiac hemodynamics in heart failure rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol,** v.313, n.4, p. H744-H756, 2017.

ZABAGLIA, L.M. et al. Decreased MicroRNA miR-181c Expression Associated with Gastric Cancer. **J Gastrointest Cancer,** v.49, n.1, p.97-101, 2018.

ZHANG, H. et al. The prognostic value of miR-34a expression in completely resected gastric cancer: tumor recurrence and overall survival. **Int J Clin exp Med**, v.8, n.2, p. 2635-2641, 2015.

ZHANG, H.; XIAO, W. TNFR1 and TNFR2 differentially mediate TNF-α-induced inflammatory responses in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Cell Biol Int,** v.41, n.4, p.415-422, 2017.

ZHANG, Z. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. **Lab Invest,** v.88, n.12, p.1358-1366, 2008.

ZHAO, C. et al. Involvement of tumor necrosis factor-α in the upregulation of CXCR4 expression in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori.* BMC Cancer, v.10: 419, 2010.

ZHAO, D. et al. MiR-19a regulates the cell growth and apoptosis of osteosarcoma stem cells by targeting PTEN. **Tumour Biol,** v.39, n.5, 2017.

ZHAO, T.; LI, H.; LIU, Z. Tumor necrosis factor receptor 2 promotes growth of colorectal cancer via the PI3K/AKT signaling pathway. **Oncol Lett,** v.13, p.342-346, 2017.

ZHOU, Y. et al. microRNA-130a is an oncomir suppressing the expression of CRMP4 in gastric cancer. **Onco Targets Ther**, v.10, p. 3893-3905, 2017.

ZHOU, Y. et al. MiR-34a, as a suppressor, enhance the susceptibility of gastric cancer cell to luteolin by directly targeting HK1. **Gene,** v.644, p. 56-65, 2018.

ZHU, Y. et al. MicroRNA-19a regulates the proliferation, migration and invasion of human gastric cancer cells by targeting CUL5. **Arch Biochem Biophys,** v. 662, p.93-100, 2019.

ANEXO

ANEXO A: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional.

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de mediadores da via de sinalização do fator de necrose tumoral-alfa e de microRNAs na carcinogênese gástrica associada a Helicobacter pylori

Pesquisador: Ana Flávia Teixeira Rossi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49559715.0.0000.5466

Instituição Proponente: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.336.892

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de doutorado, cujas responsáveis são a própria aluna e sua orientadora e será desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana - IBILCE/UNESP, Campus de São José do Rio Preto.

Na submissão do projeto, a pesquisadora solicita dispensa do TCLE, umas vez que utilizará amostras de DNA e RNA armazenadas no laboratório em decorrência de

estudos prévios (Pareceres CEP IBILCE/UNESP nº 117/08 e 030/10), em que foi obtido TCLE de todos os participantes. Nestes projetos anteriores já estava prevista a utilização do material excedente em pesquisas futuras.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto pretende auxiliar no esclarecimento de vias moleculares que participam do processo inflamatório em conseqüência da infecção pela bactéria H. pylori e atuação em processos de regulação da proliferação e morte celular.

Para isto será investigado se a via de sinalização da apoptose mediada pelo gene TNF- é influenciada pela H. pylori e por alguns de seus fatores de virulência em lesões que participam da cascata de progressão do câncer gástrico e se este processo encontra-se regulado por miRNAs. Além disto, também será realizada uma avaliação in vitro, em linhagem celular de adenocarcinoma

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265
Bairro: JARDIM NAZARETH **CEP:** 15.054-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3221-2428 **Fax:** (17)3221-2500 **E-mail:** liliane@ibilce.unesp.br

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.336.892

gástrico após indução com imunógeno, para verificar a participação dos receptores TNFR1 e TNFR2 e a ocorrência de alterações nos mesmos genes e miRNAs envolvidos na via de apoptose mediada por TNF- e em processos celulares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco é mínimo, uma vez que serão utilizadas amostras já coletadas em projetos anteriores e aprovados por este CEP em 2008 e 2010. Desta forma, não estão previstas novas coletas de amostras biológicas nos sujeitos de pesquisa, nem qualquer tipo de intervenção direta. A pesquisadora salienta também que as amostras serão referidas com códigos para não identificação dos indivíduos.

Não há benefícios diretos aos sujeitos de pesquisa. Mas indiretamente traz benefícios para o tratamento e prognóstico do câncer gástrico, pois o estudo auxiliará no esclarecimento de vias moleculares que participam do processo inflamatório em conseqüência da infecção pela bactéria H. pylori e atuação em processos de regulação da proliferação e morte celular.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem elaborado com introdução bem fundamentada e justificativas claras, objetivos bem definidos e metodologia explicitada. Será desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana - IBILCE/UNESP, contando com a orientação de Professora e Pesquisadora com larga experiência na linha de pesquisa do projeto. O cronograma encontra-se adequado ao desenvolvimento do estudo.

A pesquisadora solicita dispensa do TCLE uma vez que as amostras que serão utilizadas já se encontram armazenadas no laboratório onde será realizada a pesquisa. Salienta ainda que estas amostras armazenadas foram obtidas em projetos anteriores aprovados por este CEP (Pareceres CEP IBILCE/UNESP nº 117/08 e 030/10), quando foram obtidos os TCLEs de todos os participantes. Nestes projetos também estava previsto o armazenamento das amostras para utilização em projetos futuros.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados adequadamente.

A solitação de dispensa de TCLE está bem justificada.

Recomendações:

Diante do exposto, recomento a aprovação do projeto, bem como a dispensa do TCLE, considerando válidas as justificativas apresentadas.

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265
Bairro: JARDIM NAZARETH **CEP:** 15.054-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3221-2428 **Fax:** (17)3221-2500 **E-mail:** liliane@ibilce.unesp.br

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.336.892

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE, em reunião de 16 de novembro de 2015, deliberou, com 12 (doze) votos favoráveis e com 01 (uma) abstenção, pela aprovação do presente projeto de pesquisa. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados semestralmente, contando a partir desta data.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_574184.pdf	25/09/2015 14:47:02		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_final.pdf	25/09/2015 14:37:46	Ana Flávia Teixeira Rossi	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	25/09/2015 14:35:54	Ana Flávia Teixeira Rossi	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO JOSE DO RIO PRETO, 25 de Novembro de 2015

Assinado por:
Monica Abrantes Galindo de Oliveira
(Coordenador)

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265
Bairro: JARDIM NAZARETH **CEP:** 15.054-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3221-2428 **Fax:** (17)3221-2500 **E-mail:** liliane@ibilce.unesp.br

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, _____/_____/____

_____
Assinatura