

Nathália Maciel Maniezzo Stuchi

**Avaliação da Anexina A1, FPR1, FPR2 e miRNAs em  
adenocarcinoma gástrico**

Nathália Maciel Maniezzo Stuchi

**Avaliação da Anexina A1, FPR1, FPR2 e miRNAs em adenocarcinoma  
gástrico**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Elizabete Silva  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto, SP  
2016

Stuchi, Nathália Maciel Maniezzo.

Avaliação da Anexina A1, FPR1, FPR2 e miRNAs em adenocarcinoma gástrico / Nathália Maciel Maniezzo Stuchi. -- São José do Rio Preto, 2016

100 f. : il.

Orientador: Ana Elizabete Silva

Coorientador: Sonia Maria Olini

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Estômago – Cancer. 3. Adenocarcinoma. 4. Helicobacter pylori. 5. Anexina A1. I. Silva, Ana Elizabete. II. Olini, Sonia Maria. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 616-006.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de São José do Rio Preto

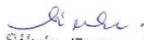


## ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **NATHÁLIA MACIEL MANIEZZO STUCHI**, RA nº: 145945-1, RG nº 44.226.207-3, expedido pela SSP/SP, defendeu, no dia 31/05/2016, a tese intitulada "**Avaliação da Anexina A1, FPR1, FPR2 e miRNAs em adenocarcinoma gástrico**", junto ao Programa de Pós Graduação em GENÉTICA, Curso de Doutorado, tendo sido 'APROVADA'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

São José do Rio Preto, 31 de maio de 2016

  
**Silvia Emiko Kazama**  
Superv. Técnico de Seção (Subst.)  
Seção Técnica de Pós-Graduação

Nathália Maciel Maniezzo Stuchi

Avaliação da Anexina A1, FPR1, FPR2 e miRNAs em adenocarcinoma  
gástrico

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

Comissão Examinadora

Profª Drª Ana Elizabete Silva  
Professora Adjunto Livre-Docente  
Orientadora

Prof. Dr. Henrique César Santejo Silveira  
Professor Assistente Doutor  
Hospital de Câncer de Barretos

Profª Drª Patricia Maluf Cury  
Professora Assistente Doutora  
FACERES

Profª Drª Dorotéia Rossi S. Souza  
Professora Adjunto Livre-Docente  
Faculdade de Medicina de São José Rio Preto

Profª Drª Debora Ap. Pires de C. Zuccari  
Professora Adjunto Doutora  
Faculdade de Medicina de São José Rio Preto

São José do Rio Preto, SP  
31 de maio de 2016

## **Sumário**

|                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------|-----|
| I. Introdução                                                | 19  |
| I.1. O Câncer gástrico                                       | 19  |
| I.2. A bactéria <i>Helicobacter pylori</i>                   | 21  |
| I.3. Inflamação, miRNAs e Câncer Gástrico                    | 26  |
| I.4. Proteína anti-inflamatória Anexina A1 e receptores FPRs | 32  |
| II. Objetivos                                                | 38  |
| II.1. Objetivos Gerais                                       | 38  |
| II.2. Objetivos específicos                                  | 38  |
| III. Artigo                                                  | 40  |
| IV. Discussão                                                | 74  |
| V. Conclusões                                                | 82  |
| Referências                                                  | 84  |
| Anexos                                                       | 96  |
| Anexo 1.                                                     | 96  |
| Anexo 2                                                      | 100 |

Dedico este trabalho ao meu filho Miguel Maniezzo Stuchi, que me ensinou o essencial da vida sem ao menos saber falar, você foi desde o princípio e sempre será minha inspiração para acreditar no melhor e ter a esperança de que tudo é possível. Agradeço a Deus todos os dias pelo privilégio de ser sua mãe. Foi por você e para você meu filho, com todo meu eterno e incomensurável amor...

Sem a ajuda de várias pessoas este trabalho jamais se realizaria, de tal forma agradeço:

A Deus por estar presente em minha vida me guardando desde o princípio, por me dar força e me manter firme na fé nos momentos mais dolorosos. À minha querida santa de devoção, Santa Rita de Cássia, por escutar todos meus lamentos e preces e zelar sempre por mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, por me conceder a oportunidade de desenvolver este trabalho, e me aceitar em seu laboratório sem ao menos me conhecer, por seus ensinamentos e por me mostrar como ser uma pessoa mais forte.

À minha coorientadora Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, que compartilhou muito de seu conhecimento e abriu as portas de seu laboratório para que grande parte desta pesquisa fosse realizada. Com admiração pessoal e profissional agradeço imensamente sua participação neste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Ao Dr. Dalísio de Santi Neto, médico chefe do setor de Patologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, que permitiu a coleta do material biológico utilizado para o desenvolvimento desta tese. Agradeço à vida por ter colocado o senhor em meu caminho, um exemplo de honestidade, profissionalismo e espiritualidade.



À Dinha secretaria do setor de Patologia do Hospital de Base, que me ajudou das maneiras mais distintas possíveis, a quem eu guardo o mais puro sentimento de gratidão.

A todos os profissionais do setor de Patologia do HB, por estarem sempre à disposição para ajudar, por me receberem tão bem durante esses anos, meu muito obrigado.

Aos colegas da FIPA (Faculdades Integradas Padre Albino), pela oportunidade e apoio durante a finalização desta tese, meu agradecimento especial à Profa. Dra. Ana Paula Girol.

Aos amigos do Instituto Adolfo Lutz, que me receberam de forma carinhosa e me incentivaram sempre para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas da FAMERP (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto) que de alguma forma contribuíram para a realização do projeto.

Ao programa e Conselho de Pós-Graduação em Genética da instituição por permitir a realização da pesquisa. Em especial à Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, com a qual tive a oportunidade de trabalhar durante a organização de dois Simpósios de Genética, e atuar no Conselho da Pós-Graduação como representante discente, a você o meu muito obrigado por me dar exemplos de ética e profissionalismo diários.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e a certeza de grande contribuição para o enriquecimento desta tese.

A todos meus colegas que passaram pelo laboratório de Citogenética e

Biologia Molecular Humana, agradeço por toda a ajuda e momentos compartilhados. Em especial agradeço à Fernanda, Ayla, Marcela e Joice pela agradável convivência, e à minha amiga Ana Flávia, menina guerreira, inteligente e dedicada pela qual guardo a maior admiração e gratidão.

Aos meus colegas do laboratório de Imunomorfologia pela ajuda na realização do trabalho, em especial as amigas Marystela e Marina.

Aos meus amigos de Londrina, Bragança Paulista e Catanduva que mesmo distantes em quilômetros sempre estiverem presentes em minha vida e meu coração, e foram grandes incentivadores para a conclusão desta tese.

Ao meu marido, Leonardo, companheiro para todas as horas, muito obrigada pelo seu carinho e compreensão nos momentos mais difíceis durante esta jornada. Com todo amor eu agradeço seu apoio.

Aos meus sogros, Beth e Roberto, sem a ajuda de vocês eu jamais finalizaria este projeto. Vocês são grandes exemplos de caridade e amor para mim, meu eterno agradecimento, que se estende também à minha cunhada Ana Paula e minha sobrinha Beatriz.

Às minhas maiores riquezas, meus pais Stella e José, meu irmão Thales e minha avó Yvone, que me ensinaram o valor da integridade, gratidão e fé para perseverar nos momentos mais distintos que passamos juntos, vocês são meu alicerce e meu exemplo. Dedico todo meu infinito amor a vocês.

Ao meu filho Miguel, estímulo e grande amor da minha vida.

“Combati o bom combate, completei a corrida, guardei a minha fé”...

2 Timóteo 4:7

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

|                  |                                                                                    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| µl               | Micro-litro                                                                        |
| µm               | Micrometro                                                                         |
| <i>ACTB</i>      | do inglês actin beta                                                               |
| Akt/PI3K         | do inglês serine-threonine kinase / Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase |
| <i>ANXA1</i>     | do inglês annexin A1                                                               |
| ANOVA            | Análise de variância                                                               |
| <i>APC</i>       | do inglês adenomatous polyposis coli                                               |
| <i>ARID1A</i>    | do inglês AT-rich interaction domain 1A                                            |
| <i>BabA</i>      | do inglês <i>blood group antigen-binding adhesion</i>                              |
| Bp               | do inglês base pairs                                                               |
| BSA              | do inglês bovine serum albumin                                                     |
| <i>cagA</i>      | do inglês <i>cytotoxin-associated gene A antigen- CagA</i>                         |
| cagPAI           | do inglês cag Pathogenicity Island                                                 |
| CDs              | do inglês dendritic cells                                                          |
| <i>CDH1</i>      | do inglês cadherin 1                                                               |
| Cdk2             | do inglês cyclin-dependent kinase 2                                                |
| <i>CD274</i>     | do inglês CD274 molecule                                                           |
| <i>COX-2</i>     | do inglês Cyclooxygenase-2                                                         |
| CXCL8            | do inglês Chemokine (C-X-C motif) ligand 8                                         |
| DAB              | do inglês 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride                                 |
| DNA              | do inglês deoxyribonucleic acid                                                    |
| <i>DupA</i>      | do inglês <i>duodenal ulcer-promoting gene</i>                                     |
| EBV              | do inglês Epstein Barr vírus                                                       |
| <i>EGFR</i>      | do inglês epidermal growth factor receptor                                         |
| EMT              | do inglês Epithelial to mesenchymal transitions                                    |
| FFPE             | do inglês formalin-fixed paraffin embedded                                         |
| FPR1             | do inglês formyl peptide receptor 1                                                |
| FPR2             | do inglês formyl peptide receptor 2                                                |
| FPR3             | do inglês formyl peptide receptor 3                                                |
| GC               | do inglês Gastric Cancer                                                           |
| <i>GLI3</i>      | do inglês GLI family zinc finger 3                                                 |
| <i>GRM8</i>      | do inglês glutamate metabotropic receptor 8                                        |
| <i>H. pylori</i> | <i>Helicobacter pylori</i>                                                         |
| <i>HIF1A</i>     | do inglês hypoxia inducible factor 1 alpha subunit                                 |
| <i>HOX</i>       | do inglês Homeobox                                                                 |
| <i>HOXB8</i>     | do inglês Homeobox B8                                                              |
| IARC             | do inglês International Agency for Research on Cancer                              |
| <i>iceA</i>      | do inglês induced by contact with epithelium                                       |
| <i>IL-1β</i>     | do inglês Interleukin beta 1                                                       |
| <i>IL-6</i>      | do inglês Interleukin 6                                                            |
| <i>IL-8</i>      | do inglês Interleukin 8                                                            |
| <i>IL-10</i>     | do inglês Interleukin 10                                                           |
| IRAK-1           | do inglês Interleukin-1 receptor-associated kinase 1                               |
| IRAK-4           | do inglês interleukin-1 receptor-associated kinase 4                               |
| <i>IRF1</i>      | do inglês Interferon regulatory factor 1                                           |

|              |                                                                                    |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| JAK/STAT     | do inglês Janus kinase/signal transducers and activators of transcription          |
| MALT-linfoma | do inglês Musoca-associated lymphoid tissue                                        |
| miRNA        | do inglês small non-coding RNA molecule                                            |
| mM           | Mili-molar                                                                         |
| MMP          | do inglês Matrix Metalloproteinase                                                 |
| MLH1         | do inglês multL homolog 1                                                          |
| MSI          | do inglês microsatellite instability                                               |
| MYC          | do inglês v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog                      |
| MyD88        | do inglês Myeloid Differentiation primary response 88                              |
| NF-kB        | do inglês Factor nuclear kappa B                                                   |
| NOD1         | do inglês Nucleotide oligomerization domain 1                                      |
| OipA         | do inglês outer inflammatory protein                                               |
| Onco-miR     | do inglês oncogenic miRNAs                                                         |
| PAMPs        | do inglês Pathogen-associated Molecular Pattern                                    |
| PDCD1LG2     | do inglês programmed cell death 1 ligand 2                                         |
| PGE2         | do inglês prostaglandin E2                                                         |
| PPARγ        | do inglês Peroxisome proliferator-activated receptor                               |
| PREX2        | do inglês phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 2 |
| PTEN         | do inglês phosphatase and tensin homolog                                           |
| qPCR         | do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>                            |
| Ras-ERK-     | do inglês Mitogen-activated protein kinase                                         |
| MAPK         |                                                                                    |
| RDX          | do inglês radixin                                                                  |
| RECK         | do inglês reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs               |
| RHO          | do inglês rhodopsin                                                                |
| RISC         | Do inglês RNA-induced silencing complex                                            |
| RNA          | do inglês ribonucleic acid                                                         |
| RNS          | do inglês reactive nitrogen species                                                |
| ROS          | do inglês reactive oxygen species                                                  |
| RT           | do inglês Reverse transcriptase                                                    |
| RTK-RAS      | do inglês receptor tyrosine and KRAS protooncogene GTPase                          |
| SabA         | do inglês sialic acid-binding adhesion                                             |
| SD           | Desvio padrão                                                                      |
| SEM          | Desvio do erro padrão                                                              |
| STAT3        | do inglês Signal transducer and activator of transcription 3                       |
| TLR2         | do inglês <i>Toll like receptor 2</i>                                              |
| TLR4         | do inglês <i>Toll like receptor 4</i>                                              |
| TNF          | do inglês Tumor necrosis fator                                                     |
| TP53         | do inglês tumor protein p53                                                        |
| TS-miR       | do inglês tumor- supressor miRNAs                                                  |
| UreA         | do inglês Urease subunit alpha                                                     |
| vacA         | do inglês <i>vacuolating cytotoxin</i>                                             |
| VEGF         | do inglês vascular endothelial growth factor                                       |

|                       |                                                        |
|-----------------------|--------------------------------------------------------|
| Wnt/ $\beta$ -catenin | do inglês Wingleless-type MMTV integration site family |
| <i>ZBTB10</i>         | do inglês zinc finger and BTB domain containing 10     |
| <i>ZEB1</i>           | do inglês zinc finger E-box binding homeobox           |

## Prefácio

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana e no Laboratório de Imunomorfologia, Departamento de Biologia IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto – SP, com bolsa CAPES (março de 2012 a junho de 2015) e Auxílio à pesquisa FAPESP (2012/15036-8) e CNPq (474776/2013-1).

O projeto de doutorado intitulado **“Avaliação da Anexina A1, FPR1, FPR2 e miRNAs em adenocarcinoma gástrico ”** teve por objetivos avaliar a expressão da proteína AnxA1 e de seus receptores FPR1 e FPR2 em pacientes com adenocarcinoma gástrico, bem como a expressão de miRNAs que possam encontrar-se desregulados e modular a expressão da anexina A1 e seus receptores, desta forma podendo contribuir para a carcinogênese gástrica.

Para a defesa da tese apresentamos o manuscrito **“Annexin-A1/FPR1 and miR-196a contribute to the pathogenesis of gastric cancer”**, submetido à revista *BMC Cancer* (Fator de Impacto:3,36; Qualis A2). São apresentados os dados de expressão da *ANXA1* e dos microRNAs miR-27a, miR196a e miR-222 e a análise de correlação da expressão desses miRNAs com a da *ANXA1*, que pode indicar se participam da regulação da expressão desse mediador inflamatório, assim como a associação da expressão do RNAm da *ANXA1* e dos miRNAs com características clinicopatológicas dos pacientes. Foram avaliados por imuno-histoquímica os receptores FPR1 e FPR2 e a expressão da anexina A1 para as amostras de adenocarcinoma gástrico. Em conjunto, os resultados sugerem que a ligação AnxA1/FPR1 atue nas vias de regulação da inflamação e carcinogênese gástrica, e evidencia pela primeira vez para o câncer gástrico que a *ANXA1* possa ser regulada pelo miR-196a abrindo novas perspectivas de condutas terapêuticas para esta neoplasia.

**Resumo**

Apesar do declínio da incidência, o câncer gástrico ocupa ainda a terceira posição em causa de morte por câncer no mundo, tendo como principal fator de risco a bactéria *Helicobacter pylori*. Esta bactéria pode levar a uma inflamação persistente através da produção de citocinas pró-inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, estimulando a proliferação celular bem como outros processos envolvidos na carcinogênese. Ainda envolvidos nestes processos tem sido observada a participação de microRNAs, que exercem papel importante na regulação pós-transcricional, influenciando processos fisiológicos normais da célula bem como aqueles ligados às doenças, como por exemplo o câncer gástrico. Alguns miRNAs podem atuar como oncogenes, genes supressores de tumor e biomarcadores para diversas patologias, podendo alvejar genes relacionados com inflamação e câncer como o gene *ANXA1* (Anexina-A1). A Anexina-A1 é uma proteína anti-inflamatória e com ação anti-proliferativa, que se liga à receptores do tipo formil peptídeo como por exemplo FPR1 e FPR2, ambos sabidamente relacionados com a progressão de doenças como o câncer. Desta forma o presente trabalho teve como objetivos avaliar a expressão da proteína Anexina A1 e seus receptores FPR1 e FPR2, bem como avaliar a expressão do RNAm da *ANXA1* e de miRNAs que possam modular a expressão desse gene (hsa-mir-27a, hsa-mir-196a e hsa-mir-222) em adenocarcinoma gástrico e correlacionar estes resultados com os aspectos clínico-patológicos. Foram avaliadas 31 amostras de adenocarcinoma gástrico, assim como as regiões metaplásica ou normal adjacentes ao tumor. A quantificação relativa (RQ) do RNAm da *ANXA1* e miRNAs foi realizada por PCR quantitativo em tempo real utilizando ensaio TaqMan, e a expressão proteica da AnxA1, FPR1 e FPR2 por imuno-histoquímica e análise densitométrica. Em relação à expressão gênica relativa foram observados o aumento da expressão da *ANXA1* nos tumores (RQ=1,374;  $p<0,001$ ), assim como do miR-196a que apresentou aumento de expressão tanto no tecido metaplásico (RQ= 4,784;  $p=0,0016$ ) e tumoral (RQ=16,99;  $p<$



0,001) em relação ao tecido normal. O miR-27a não se apresentou diferencialmente expresso nos diferentes tecidos e houve diminuição da expressão do miR-222 (RQ=0,687; p=0,01) no tecido tumoral em relação ao tecido normal. Apenas o miR-196a e a *ANXA1* apresentaram correlação significativamente inversa ( $r = -0,55$ ;  $p = 0,003$ ), e este miRNA foi o único que apresentou associação com o sexo feminino, devido aumento de expressão em mulheres. Quando se comparou a expressão relativa aos parâmetros clínico-patológicos e tumorais não foram encontradas diferenças significativas. Quanto à expressão proteica o FPR2 não apresentou marcação no tecido normal, metaplásico e tumoral. Contudo a AnxA1 e FPR1 apresentaram imunomarcação positiva amplamente distribuída no tecido tumoral e positivamente correlacionados tanto no epitélio ( $r = 0,87$ ;  $p < 0,0001$ ) como estroma ( $r = 0,62$ ;  $p = 0,004$ ). Portanto, nossos resultados sugerem que a *ANXA1* é modulada pelo miR-196a em câncer gástrico, e evidenciam que tanto a AnxA1 como o FPR1 também estão envolvidos no processo de carcinogênese gástrica. Tais achados podem abrir possibilidades para futuros estudos sobre novos alvos terapêuticos já que AnxA1 e FPR1 são possíveis alvos farmacológicos, e as terapias baseadas em microRNAs tem sido amplamente pesquisadas.

**Palavras-chave:** neoplasias gástricas, Anexina A1, FPR1, FPR2, microRNA-27a, microRNA-196a, microRNA-222.

## Abstract

Gastric cancer still ranks third in cause of cancer death worldwide, despite the decline in its incidence, being *Helicobacter pylori* the main risk factor for this disease. This bacterium can lead to persistent inflammation via the production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen and nitrogen species, stimulating cell proliferation and other processes involved in carcinogenesis. Still involved in this process, it has been observed the participation of miRNAs, which play an important role in post-transcriptional regulation, influencing normal physiological processes of the cell as well as those linked to diseases such as gastric cancer. Some miRNAs can act as oncogenes, tumor suppressor genes and biomarkers for various diseases, can targetting genes linked to inflammation and cancer such as *ANXA1* gene (Annexin A1). Annexin A1 is an anti-inflammatory protein with anti-proliferative action that binds to formyl peptide receptors such as, FPR1 and FPR2, both known to be related to the progression of diseases such as cancer. Thus, the present study aimed to evaluate the expression of Annexin A1, FPR1 and FPR2 receptors, and the expression of mRNA *ANXA1* and miRNAs (hsa-mir-27a, hsa-mir-196a and hsa-miR 222) in gastric adenocarcinoma, also correlate these results to the clinicopathological features. 31 adenocarcinoma samples were evaluated, as well as normal or metaplastic region adjacent to the tumor. Relative quantification (RQ) of miRNA and mRNA *ANXA1* was evaluated by TaqMan assay and protein expression AnxA1, FPR1 and FPR2 by immunohistochemistry and densitometry analysis. Regarding the relative expression the following results were observed, increased expression in tumors of *ANXA1* (RQ = 1.374;  $p < 0.001$ ) and miR- 196a that showed increased expression in the metaplastic tissue (RQ = 4.784;  $p = 0.0016$ ) and tumor (RQ = 16.99;  $p < 0.001$ ) compared to normal tissue. The miR- 27a did not appear differentially expressed in different tissues and there was a decrease of miR -222 expression (RQ = 0.687;  $p = 0.01$ ) in tumor tissue compared to normal tissue. Only the miR-196a and *ANXA1* presented

a significant inverse correlation ( $r = -0.55$ ;  $p = 0.003$ ), and this miRNA was the only one that showed association to female gender, due to increased expression in women when comparing the relative expression to clinicopathological parameters and tumor features. The FPR2 was not expressed in normal, metaplastic and tumor tissue. However, the AnxA1 and FPR1 were widely distributed positive immunostaining in tumor tissue and positively correlated both in the epithelium ( $r = 0.87$  ;  $p < 0.0001$ ) and stromal ( $r = 0.62$  ;  $p = 0.004$ ). Thus, our results suggest that *ANXA1* is modulated by miR-196a in gastric cancer, and evidencing that both AnxA1 and FPR1 are also involved in gastric carcinogenesis process. These data open the possibility for future studies on new therapeutic targets since AnxA1 and FPR1 are adjustable pharmacological targets, and microRNAs ` therapies have been widely researched.

**Key-words:** stomach neoplasms, Annexin A1, FPR1, FPR2, MIRN27a microRNA, MIRN196a microRNA, MIRN222 microRNA.



# *Introdução*

## **I. Introdução**

### **I.1. O Câncer gástrico**

O câncer gástrico é uma causa considerável de morbidade e mortalidade (MEZA-JUNCO et al., 2011), ocupando a terceira colocação em causa de morte por câncer no mundo e a quinta posição em incidência (FERLAY et al., 2015). Apesar do declínio da incidência deste tipo de câncer ter sido relatado em alguns estudos (MIHMANLI et al., 2016), o último levantamento realizado pelo GLOBOCAN em 2012 estimou cerca de 951.000 casos diagnosticados e 723.000 mortes em decorrência desta doença (FERLAY et al., 2015), ou seja, cerca de 10% das mortes por câncer no mundo são atribuídas ao câncer gástrico anualmente, com maior incidência no Leste da Ásia, Europa Oriental e América do Sul (JEMAL et al., 2011; STRAATMAN et al., 2016). No Brasil a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2015) para a incidência de câncer gástrico no biênio 2016-2017 é de 7.600 casos entre as mulheres e 12.920 entre os homens, sendo o quarto tipo mais incidente entre os homens e o quinto entre as mulheres.

O câncer gástrico pode ser dividido em três tipos principais: adenocarcinoma, linfoma e leiomiossarcoma (INCA, 2015). O adenocarcinoma gástrico é mais frequente correspondendo à 95% dos casos e classificado histologicamente como tipo difuso e intestinal (Lauren, 1965). O adenocarcinoma gástrico do tipo difuso aparece normalmente nas pessoas mais jovens e consiste de um infiltrado de células neoplásicas pouco diferenciadas onde não há formação de estrutura glandular. A forma mais prevalente do adenocarcinoma gástrico é o adenocarcinoma do tipo intestinal, onde há a transição da mucosa normal para gastrite crônica superficial, que evolui para gastrite atrófica e metaplasia intestinal, e finalmente para displasia e adenocarcinoma (CORREA, 1992; POLK; PEEK, 2010). Há grande variação entre cada caso de câncer gástrico em relação ao tipo histológico, bem como às características

cl clinicopatológicas, o que se traduz em dificuldade para identificar subtipos histológicos e por consequência definir a melhor proposta terapêutica (GRABSCH; TAN, 2013).

Embora a classificação histológica do câncer gástrico seja muito utilizada, alguns estudos recentes propõem uma classificação conforme as variações moleculares, como: vírus Epstein-Barr positivos (EBV), instabilidade de microssatélites (MSI), genomicamente estável e cromossomicamente instável.

Células de câncer gástrico positivas para o EBV apresentam repressão frequente do supressor tumoral *PTEN*, mutações no gene *ARID1A* levando a perda de função do mesmo devido a indução de códons de parada. É possível observar também aumento da expressão de genes ligados à evasão das células neoplásicas do sistema imune do hospedeiro (*CD274* e *PDCD1LG2*). As MSIs são mais comuns em pacientes idosos e ocorrem principalmente nos tumores do tipo intestinal, com frequente silenciamento do gene *MLH1*, por hipermetilação de sua região promotora, levando a falha no sistema de reparo por pareamento errôneo. Para os casos genomicamente estáveis nota-se o acometimento de pessoas mais jovens com predominância dos tumores do tipo difuso, nos quais as taxas de mutações são baixas. Já para os tumores cromossomicamente instáveis as aneuploidias são encontradas em cerca de 50% dos casos com maior incidência nos tumores do tipo intestinal, mutações nos genes *TP53*, *GLI3*, *PREX2* e *GRM8* são comumente encontradas (LIM et al., 2016). O câncer gástrico foi subdividido de acordo com estes aspectos moleculares na tentativa de facilitar o diagnóstico e tratamento desta neoplasia, tendo em vista que a genômica visa novos alvos terapêuticos em busca da medicina personalizada.

Cerca de 80% dos pacientes são diagnosticados na fase avançada da doença, pois a maioria apresenta poucos sintomas alarmantes, como perda de peso, falta de apetite, anemia, dor epigástrica, náusea e vômito, sendo 40% assintomáticos (SCHMIDT et al., 2005; BORNSCHEIN et al., 2010). Devido ao pequeno número de pacientes diagnosticados em

estágios iniciais da doença, a taxa de sobrevivência permanece baixa (LEE et al., 2016). O tratamento padrão para este câncer inclui ressecção completa do tumor em conjunto com quimioterapia pré e pós-operatória, entretanto mesmo após esta conduta cerca de 40% dos pacientes apresentam recorrência e em torno de 30% morrem no prazo de 12 meses (PECQUEUX et al., 2015).

Diversas pesquisas indicaram alguns fatores de risco associados ao câncer de estômago, dentre eles: idade avançada acima de 70 anos, sexo masculino, etnia, status socioeconômico, fumo, alta ingestão de sal, nitritos, nitratos e álcool (KELLEY AND DUGGAN, 2003; CAO et al., 2016). Porém a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é considerada o principal fator de risco para o câncer de estômago (CHOLI-PAPADOPOULOU et al., 2011; DE FLORA; LA MAESTRA, 2015).

A gastrite crônica é um dos sinais que caracterizam a infecção por *H. pylori*, (TOUATI, 2010) e esta inflamação persistente estimula a proliferação celular, induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), o que pode levar a alterações proteicas, danos à membrana, oxidação de bases de DNA, quebras de fitas de DNA e aberrações cromossômicas, muitos destes envolvidos no processo de carcinogênese (JANG et al., 2003). Danos extensos e persistentes ao DNA representam uma ameaça à estabilidade do genoma. Uma vez detectado é ativada uma complexa rede que bloqueia o ciclo celular, inicia o reparo do DNA, e em alguns casos, induz a apoptose celular (BOLDERSON et al., 2009).

## **1.2. A bactéria *Helicobacter pylori***

O *H. pylori* é um bacilo Gram-negativo que coloniza o estômago humano há pelo menos 60.000 anos (ATHERTON; BLASER, 2009); é uma bactéria microaerófila que habita várias áreas do estômago e do duodeno (PANDEY et al., 2010), sendo considerada a principal



causa de úlcera péptica, linfoma gástrico e adenocarcinoma gástrico (ISOMOTO et al., 2010).

Os australianos Barry Marshal e Robin Warren foram os descobridores desta bactéria e receberam o prêmio Nobel de Medicina em 2005. Eles encontraram o *H. pylori* no estômago de 75% de pacientes com úlceras gástricas, e observaram também que a inflamação gástrica estava quase sempre presente na mucosa próxima onde a bactéria era encontrada (KAMANGAR et al., 2011).

Este micro-organismo apresenta mobilidade devido à presença de flagelos unipolares (quatro a seis) que permite sua locomoção na camada de muco gástrico. A bactéria desenvolveu estratégia para sobreviver no ambiente ácido do estômago, por meio da secreção de urease, uma enzima que converte ureia em amônia, que reduz a acidez do estômago, facilitando sua colonização (MARSHALL BJ, 1983).

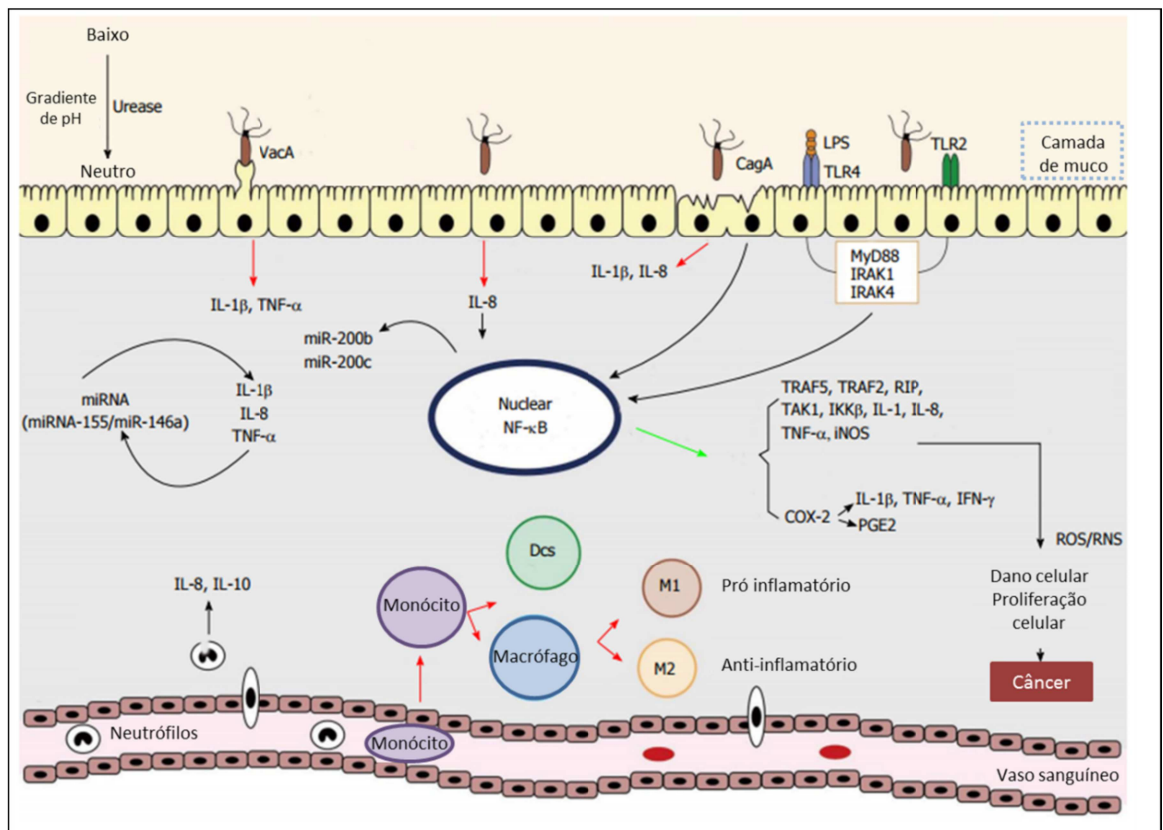
As vias de infecção do *H. pylori* mais aceitas atualmente incluem a fecal-oral e a oral-oral (DELTENRE; DE KOSTER, 2000), sendo a mais comum infecção bacteriana entre os homens, colonizando cerca de 50% da população mundial (ATHERTON; BLASER, 2009; LEE et al., 2016).

Diversos estudos genômicos comprovaram a alta diversidade genética desta bactéria (DORER et al., 2010; RAYMOND et al., 2016). Apesar da infecção ocorrer mais comumente por uma cepa, infecções mistas com diferentes cepas da bactéria e casos de recombinação genética entre as mesmas já foram observadas em diversos estudos (ISRAEL et al., 2001; TALARICO et al., 2009). Considerando a diversidade genética da *H. pylori*, que se traduz em variabilidade na virulência (KAMANGAR et al., 2011), os estudos sobre os fatores de virulência durante quase três décadas revelaram uma relação importante entre a bactéria, a superfície da mucosa gástrica e a patogênese da doença (Figura 1), destacando os fatores CagA e VacA (HATAKEYAMA, 2008; SEWALD et al., 2008; WEN; MOSS, 2009; RANJBAR et al., 2016).

CagA é uma proteína efetora da bactéria que é injetada nas células do hospedeiro por uma maquinaria especializada que modula uma série de funções celulares (RICCI et al., 2011), como estimular a sinalização de fatores de crescimento, levando a mudanças morfológicas na célula e aumentando a proliferação celular (MIMURO et al., 2002; COVER, 2016). CagA é um marcador da presença de uma ilha de patogenicidade (*PAI- Pathogenicity Island*) e contribui para a resposta inflamatória, já que causa um aumento na produção de IL-8 (ISOMOTO et al., 2010) e ativação do *NF-κB* o que pode conferir um fenótipo proliferativo à bactéria, sendo importante no processo de carcinogênese (ARGENT et al., 2008; HU et al., 2016). As cepas *cagA*<sup>+</sup> são associadas a um aumento da inflamação, pois induzem níveis aumentados de algumas citocinas, como a IL-1β e a IL-8, com consequente aumento do risco de desenvolvimento do câncer gástrico (HATAKEYAMA, 2008; BARTCHEWSKY et al., 2009). Desta forma CagA desregula as vias de sinalização celular e confere às células potencial oncogênico, o que é relevante durante o processo de patogênese do *H. pylori* (DING et al., 2010).

O segundo fator de virulência mais estudado é o VacA (YAMAOKA, 2010). O gene *vacA* codifica uma proteína secretora (VacA) que tem a habilidade de induzir a vacuolização das células (POLK; PEEK, 2010), aumentar a permeabilidade a ânions e uréia (Tombola et al., 2001), estimular a apoptose em células gástricas epiteliais (COVER et al., 2003) e induzir uma resposta pró-inflamatória (SUNDRUD et al., 2004). O gene *vacA* é expresso em todas as cepas de *H. pylori*, porém existem polimorfismos: tipo S1 ou S2 e tipo M1 ou M2. A proteína codificada por este gene consiste de duas regiões variáveis, a região sinal (S) localizado na extremidade N - terminal da proteína e a região mediana (M). Existem dois tipos principais da região S: segmentos S1 e S2, e três menores: S1a, S1b e S1c. A região M também é conhecido por ter dois genótipos principais: M1 e M2 e os dois subtipos: M1a e M1b (PAJAVAND et al., 2015). O tipo S1/M1 VacA causa mais dano epitelial celular que o tipo S1/M2, enquanto o

tipo S2/M2 e o raro S2/M1, não são tóxicos devido à presença de um resíduo hidrofílico na forma S2 (Letley et al., 2003). Portanto, o fator VacA pode induzir múltiplas atividades celulares que facilitam a colonização crônica da mucosa gástrica pelo *H. pylori* (ISOMOTO et al., 2010).



**Figura 1: Patogênese da infecção pela bactéria *H. pylori* e a resposta imune do hospedeiro.** **A:** a colonização das células epiteliais gástricas pela bactéria acontece com o auxílio de fatores de virulência da bactéria (CagA, VacA, DupA, IceA e OipA), adesinas (SabA e BabA) e reconhecimento pelos receptores *toll*-like. **B:** após reconhecimento ocorre a ativação do sistema imunológico do hospedeiro, com ação do NF-κB, a secreção de várias citocinas pró e anti-inflamatórias e ativação das vias de oncogênicas. **C:** há também a ativação do sistema imune inato com o recrutamento de células inflamatórias no local da infecção. **D:** a expressão de alguns miRNAs é alterada pela bactéria e influencia o sistema imune do hospedeiro. LPS: lipopolissacarídeo; TLR2: receptores do tipo *toll* 2; DCs: células dendríticas; M1: macrófagos do tipo 1; M2: macrófagos do tipo 2 (Adaptado de CADAMURO et al., 2014).

Os fatores de virulência em conjunto com fatores genéticos do hospedeiro e fatores ambientais, constituem uma complexa rede que regula a patogênese da gastrite crônica e inflamação, os quais estão envolvidos em um processo que leva à carcinogênese gástrica

(AHN; LEE, 2015).

Já está bem estabelecido que a infecção por *H. pylori* acontece normalmente na primeira infância e após este período, se não houver o tratamento adequado com antibióticos, a infecção pode perdurar por toda a vida do indivíduo (MORELLI et al., 2010; COVER, 2016). Apesar do *H. pylori* estimular respostas imunes inata e adquirida, o portador é incapaz de eliminar a bactéria da mucosa gástrica, e a infecção crônica é o resultado mais comum deste processo (ZARRILLI et al., 1999).

Esta capacidade de colonização por longos anos se deve, entre outros fatores, à capacidade deste micro-organismo de evadir o sistema imune do hospedeiro. Entre 80-90% das bactérias ficam na camada de muco, enquanto de 10-20% ficam em contato direto com a superfície das células epiteliais, como consequência, uma resposta inflamatória persistente é estabelecida na lâmina própria adjacente, o que previne o contato direto entre a bactéria e o lúmen, como também de células inflamatórias com o estroma. Desta forma, as células brancas do sangue, que normalmente reconheceriam e atacariam a bactéria, se tornam incapazes de atravessar os vasos sanguíneos que vão até a mucosa do estômago. Estas células continuam a responder ao sítio de infecção, onde morrem liberando nutrientes que servem de substrato ao *H. pylori* (PANDEY et al., 2010). A permanência da bactéria no estômago estimula a ativação de uma cascata de citocinas que são responsáveis pelo desenvolvimento do processo inflamatório, por apresentarem atividades quimiotáticas para neutrófilos e células mononucleares (VINAGRE et al., 2011; CADAMURO et al., 2014).

O *H. pylori* tem influência direta sobre mecanismos epigenéticos, como por exemplo, metilação de genes e modificação de histonas. A infecção por esta bactéria induz a metilação anormal da região promotora de genes da mucosa gástrica, incluindo genes relacionados ao crescimento celular, reparo de DNA e aderência celular, e que são conhecidamente metilados em câncer gástrico (MAEKITA et al., 2006; NARDONE et al., 2007; KEILBERG;

OTTEMANN, 2016). As histonas (H2A, H2B, H3 e H4), unidades básicas do nucleossomo, podem sofrer modificações covalentes em suas caudas que saem do nucleossomo, permitindo que proteínas regulatórias acessem o DNA e regulem a transcrição. Modificações em caudas de histonas causadas por metilação, acetilação, fosforilação entre outros agem em diversos processos celulares, como regulação gênica, reparo de DNA e crescimento celular, tendo sido relacionadas a infecção pela *H. pylori* (ZHANG; REINBERG, 2001; KURDISTANI, 2007; DING ET AL., 2010).

A erradicação do *H. pylori* requer tratamento com múltiplos antibióticos, amoxicilina e claritromicina, que são administrados de 7 a 14 dias, e um IBP (inibidor da bomba de prótons) como, por exemplo, o omeoprazol (CHEY ET AL., 2007; MAKHLOUGH ET AL., 2016). A erradicação da bactéria reduz significativamente o risco de desenvolvimento de câncer de estômago em indivíduos infectados pelo *H. pylori* sem a presença de lesões pré-malignas (WONG et al., 2004; FUCCIO et al., 2009; LEE et al., 2016), desta forma reforçando o conceito de que este micro-organismo influencia estágios iniciais da carcinogênese gástrica (POLK; PEEK, 2010).

### **1.3. Inflamação, miRNAs e Câncer Gástrico**

Vários estudos indicaram a inflamação crônica como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, dentre eles, o câncer de bexiga (OTTO et al., 2011), pâncreas (ZHUANG et al., 2014), próstata (ZHANG et al., 2012) e câncer gástrico (VANNELLA et al., 2012).

O câncer gástrico é um modelo interessante para estudos sobre esta associação da inflamação e câncer, considerando-se que mediadores pró e anti-inflamatórios estão associados a este fenômeno (SHACTER; WEITZMAN, 2002; RASCH; ALGUL, 2014). A

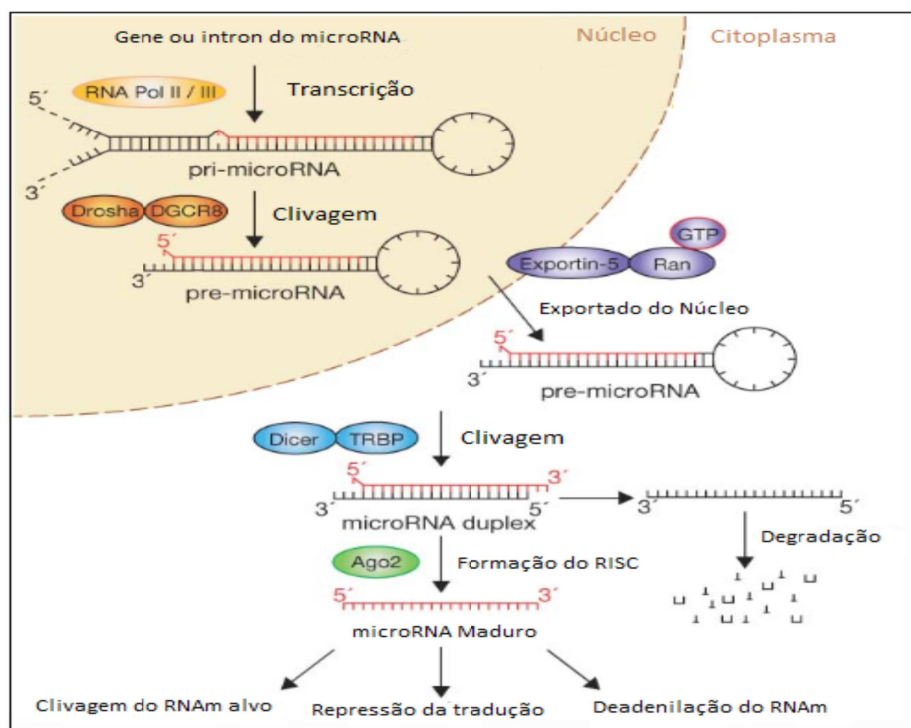
inflamação

crônica pode levar a tumorigênese através de danos ao DNA causado por ERO e ERN, que levam a um aumento da proliferação celular, e estimulam a angiogênese (MCARDLE et al., 2006).

Mudanças significativas ocorrem no conteúdo celular de tecidos inflamados sendo que fatores humorais produzidos neste local atraem vários componentes do sistema imune, com infiltração de células inflamatórias e ativação de citocinas, como IL-6 e IL-8 induzidas pelo estresse oxidativo, que apresentam função importante na angiogênese, metástase e regulação de células tronco do câncer. A IL-6 também leva a ativação transcricional de *NF-κB* nas células inflamatórias (KORKAYA; WICHA, 2011).

É importante destacar também o papel dos microRNAs (miRNAs) nos processos de inflamação, carcinogênese, progressão e metástase. Os miRNAs pertencem a uma classe de RNAs pequenos, endógenos e não-codantes, que têm papel regulatório importante na expressão gênica (BARTEL, 2004), participando de vários processos biológicos.

Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II e são processados ainda no núcleo pela enzima DROSHA, originando os pré-miRNAs, que são exportados para o citoplasma se tornando miRNAs maduros por meio da ação da enzima DICER. Uma das fitas geradas pelo miRNA maduro conduzirá a repressão do RNAm alvo ao se integrar ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) (BARTEL, 2004). O RNAm alvo é reconhecido pelos miRNAs maduros por meio da região *seed* e pareamento com a região 3' não-traduzida (3'UTR) do RNAm alvo (GU et al., 2009), resultando na degradação do mesmo quando houver complementariedade completa, ou repressão da tradução (Figura 2) (WU; BELASCO, 2008). É válido destacar que cada miRNA pode regular diversos genes (JOHN et al., 2004). Acredita-se que mais de 30% dos genes em mamíferos sejam regulados por miRNAs (ISOMOTO et al., 2010).

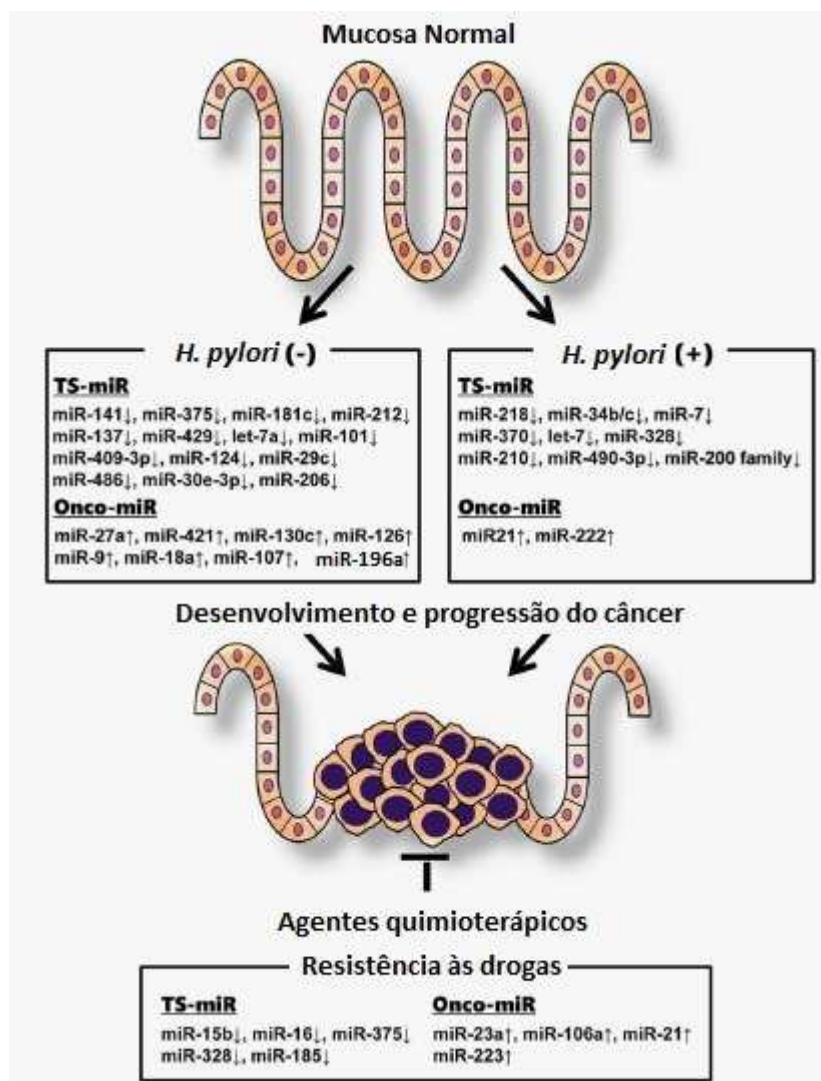


**Figura 2: Biogênese e ação dos miRNAs.** Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II e passam por processamento no núcleo pela ação da enzima *Drosha*, originando os pré-miRNAs. Estes são exportados para o citoplasma pela *Exportin 5*, e são reconhecidos pela *Dicer*, a qual processa os pré-miRNAs em miRNAs maduros. Uma das fitas deste miRNA é selecionada para integrar o complexo RISC, que conduzirá a repressão da tradução do RNAm alvo por meio do pareamento entre o miRNA maduro e a região UTR 3' do RNAm. (Adaptado de WINTER et al., 2009).

No câncer gástrico há relatos de que a expressão de vários miRNAs pode ser alterada, alguns dos quais atuando como oncogenes como o miR-27a, miR-21, miR-107 e miR-155 ou supressores de tumor como o miR-34b e miR-34c, miR-101, miR-146a e miR-148a (RICARTE FILHO ; KIMURA, 2006; SAITO et al., 2011; ISHIMOTO et al., 2016). Outros miRNAs também têm sido correlacionados ao câncer gástrico como os miR-196a e miR-196b (LIAO et al., 2012), miR-222 (LI, N. et al., 2012) e miR-223 (LI, J. et al., 2012), os quais encontram-se com expressão aumentada, exibindo papel de oncogenes, e os miRNAs miR-409-3p (LI, C. et al., 2012) e miR-495 (LI, Z. et al., 2012) envolvidos na diminuição da proliferação celular, ativação da apoptose e invasão celular, respectivamente, assumindo a

função de supressores tumorais para esta patologia.

Em recente estudo de revisão foi confirmada a associação de diversos miRNAs e o câncer gástrico, tanto na presença e ausência da bactéria *H. pylori* (Figura 3), enfatizando a ação dos miRNAs na carcinogênese, progressão e metástase, podendo ser indicados como potenciais biomarcadores para diagnóstico precoce e como novos alvos terapêuticos (ISHIMOTO et al., 2016).



**Figura 3: miRNAs envolvidos na carcinogênese e terapia do câncer gástrico.** O câncer gástrico pode ser subdividido em dois grupos, aqueles com a presença da bactéria *H. pylori* na mucosa gástrica e outro na ausência da mesma. Diferentes miRNAs interferem diretamente no processo carcinogênico como na resposta aos agentes terapêuticos. TS-miR: *tumor-suppresso miRNAs*; Onco-miR: *oncogenic miRNAs*. (Adaptado de ISHIMOTO et al., 2016).



O miR-27a atua como oncogene no câncer gástrico, pois tem como alvo o RNAm de genes supressores de tumor, importantes na regulação do ciclo celular. Já foi constatado que a repressão do miR-27a poderia inibir a proliferação celular, bem como a resistência a quimioterápicos em células de câncer gástrico, onde os genes *ZEB1*, *ZEB2*, *Slug*, *Vimentin*, envolvidos na transição epitélio-mesênquima, pela ativação da via Wnt, se apresentavam hiperexpressos, enquanto a E-caderina se apresentava reduzida. Também já foi validado o gene *APC* como alvo deste miRNA resultando na atuação direta desta interação sobre o processo de metástase gástrica (ZHANG et al., 2011). O aumento da expressão deste miRNA foi correlacionado negativamente com a expressão do gene *ZBTB10*, induzindo o aumento de metástase para esta neoplasia (SUN et al., 2010). De forma oposta, a diminuição da expressão deste miRNA, leva ao decréscimo significativo da expressão da glicoproteína P resultando na ativação transcricional da ciclina D1, aumento da expressão de p21, reforçando a relação do miR-27a com proliferação celular e resistência às drogas em câncer gástrico. Portanto, sendo considerado um alvo interessante para a terapia do câncer (ZHAO et al., 2011), biomarcador de quimiossensibilidade e prognóstico em câncer gástrico recorrente ou metastático (HUANG et al., 2014), além de biomarcador plasmático para detecção precoce desta neoplasia (ISHIMOTO et al., 2016).

O miR-196a é considerado um oncogene para diferentes tipos de câncer dentre eles o câncer gástrico. Para esta neoplasia o aumento da expressão deste miRNA está associado com metástase em linfonodo, estágio clínico, sendo indicado como interessante biomarcador (LI et al., 2016). Ambos os miR-196a e 196-b estão envolvidos em processos celulares importantes como desenvolvimento do câncer, imunidade, inflamação e defesa viral (TSAI et al., 2014). O aumento da expressão dos miR-196 a e b, foi associado com a progressão tumoral e diminuição da sobrevida, com aumento da capacidade de migração e invasão das células cancerosas, tendo o gene *RDX* (Radixin) como alvo validado. Este gene está envolvido na

ligação da actina à membrana plasmática, então a superexpressão do gene *RDX* ou a inibição dos miR-196a e b, é avaliada quanto ao potencial terapêutico para suprimir a metástase gástrica (TSAI et al., 2014).

O miR-222, considerado um onco-miR apresenta expressão aumentada tanto no câncer gástrico como em mucosa gástrica infectada pela *H. pylori*, podendo ter papel importante na iniciação e progressão dessa neoplasia, provavelmente pela regulação da expressão da proteína RECK (*reversion-inducing cystein-rich protein with Kazal motifs*) (LI et al., 2012). Em linhagem celular de câncer gástrico, SGC7901, este miRNA e o miR-221 têm sido avaliados quanto ao potencial terapêutico. A inibição desses miRNAs leva a reversão do fenótipo maligno com consequente diminuição do crescimento celular e invasão e aumento da radiosensibilidade, possivelmente pela modulação da expressão do gene *PTEN*, considerado alvo validado para estes miRNAs (CHUN-ZHI et al., 2010). O aumento da expressão dos miR-221 e miR-222 também foi relacionado à progressão tumoral em camundongos, com ativação da Cdk2 facilitando a transição G1/S, e regulação de p27 e p53 (KIM et al., 2009). Além do mais, este miRNA encontra-se dentre aqueles com expressão alterada em estudos para detecção de miRNAs circulantes associados com metástases em linfonodos em câncer gástrico (KIM et al., 2013) e diagnóstico em estágios iniciais (LIU et al., 2014; ZHENG et al., 2014). Portanto, sendo considerado como possível marcador plasmático para esta neoplasia (FU et al., 2014; WANG et al., 2014).

A partir de consulta na literatura e bancos de dados públicos (LUTHRA et al., 2008; MIRBASE, RELEASE 21. JUNE 2014) que apresentam a relação de miRNAs e genes alvos validados para diferentes patologias foi possível selecionar os miRNAs hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-196a-5p e hsa-miR-222-3p para avaliação no presente estudo (Tabela 1). Estes miRNAs estão diretamente envolvidos no processo de carcinogênese gástrica, infecção pela *H. pylori* e regulação de mediadores inflamatórios como a *ANXA1*.

**Tabela 1:** miRNAs selecionados para o presente estudo e alguns de seus alvos previamente validados.

| miRNA                                                                                         | Alvos Validados e Atuação                                                                                                                                                                 | Referências                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| hsa-miR-27a-3p<br><br>Localização: cromossomo 19<br><br>Sequência:<br>UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC   | <i>TP53, EGFR</i><br>Atua como oncogene em<br>câncer gástrico<br>Marcador de<br>quimiosensibilidade e<br>prognóstico em câncer<br>gástrico<br>Marcador plasmático<br>para câncer gástrico | MIRBASE<br>MIRTARBASE<br>NISHIZAWA ;<br>SUZUKI, 2013                   |
| hsa-miR-196a-5p<br><br>Localização: cromossomo 17<br><br>Sequência:<br>UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG | <i>ANXA1, MYC</i><br><i>RDX</i><br><i>P27</i><br>Associado à invasão e<br>metástase em câncer<br>gástrico                                                                                 | MIRBASE<br>MIRTARBASE<br>PIN et al., 2012,<br>TSAI et al., 2014        |
| hsa-miR-222-3p<br><br>Localização: cromossomo X<br><br>Sequência:<br>AGCUACAUCUGGCUACUGGGU    | <i>TP53</i><br><i>P27, MYC</i><br><i>RECK</i><br>Marcador plasmático<br>para câncer gástrico                                                                                              | MIRBASE<br>MIRTARBASE<br>TARBASE<br>LI et al., 2012<br>FU et al., 2014 |

#### I.4. Proteína anti-inflamatória Anexina A1 e receptores FPRs

A proteína anexina A1 (AnxA1) tem sido associada à diversos processos inflamatórios crônicos e com o câncer. Esta proteína é descrita como anti-inflamatória e pertence à uma família de 13 proteínas encontradas em mamíferos (FERNANDES et al., 2010; ZHU et al., 2010; SUGIMOTO et al., 2016), se liga ao cálcio e a fosfolipídeos e além da ação anti-inflamatória apresenta também ação antiproliferativa (ZHU et al., 2010). Outras funções da AnxA1 são, o crescimento celular, fusão de membrana, endocitose e exocitose, transdução de sinais, diferenciação de queratinócitos, apoptose e resistência a drogas (HUO; ZHANG, 2005;

ALVES et al., 2008; JOHN et al., 2008; GUO et al., 2013). Expressão alterada da AnxA1 tem sido descrita em diversos tipos de neoplasias, estando aumentada nos cânceres de fígado (Suo et al., 2012), pulmão (BIAOXUE et al., 2012), pâncreas (YOSHIDA et al., 2011), melanoma (RONDEPIERRE et al., 2009), colorretal (SU et al., 2010), endométrio (VOISIN et al., 2011) e gástrico (JORGE et al., 2013; POLLI-LOPES et al., 2013; ZHANG et al., 2013), e apresentando diminuição da expressão para os cânceres de próstata (D'acunto et al., 2010), esôfago (MOGHANIBASHI et al., 2012), boca (NOMURA et al., 2009), laringe (SILISTINO-SOUZA et al., 2007) e linfoma (VISHWANATHA et al., 2004). Entretanto para algumas neoplasias esta relação ainda não se apresenta bem definida, como por exemplo, em leucemias, câncer de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, câncer colorretal, hepatocarcinoma e câncer gástrico, comprovando desta forma sua ação tumor-específica (GUO et al., 2013; GAO et al., 2014).

Em 1997 foi publicado o primeiro estudo relacionando a AnxA1 e o câncer gástrico, esta ainda conhecida na época como Lipocortina 1, foi encontrada no fluido ascítico de pacientes com câncer gástrico, e apresentava relação com a imunossupressão nos pacientes estudados (KOSEKI et al., 1997). Posteriormente, aumento da expressão desta proteína foi observado em duas linhagens de câncer gástrico, sendo uma delas relacionada com resistência múltipla a drogas (SINHA et al., 1998). Em estudo semelhante realizado com linhagens de câncer gástrico, porém com alto poder metastático, foi encontrado um *cluster* gênico hipoexpresso onde se localizava o gene *ANXA1*, sendo este o primeiro resultado evidenciando expressão reduzida em câncer gástrico (HIPPO et al., 2001).

Resultado semelhante foi relatado por YU et al. (2008), que observaram expressão significativamente reduzida da Anexina A1 conforme a progressão do câncer gástrico e sugeriram como um biomarcador negativo para o desenvolvimento e progressão deste tipo de neoplasia. Após esta contradição, pesquisadores investigaram a expressão do RNAm da

*ANXA1* nos dois tipos de adenocarcinoma gástrico, tipo difuso e tipo intestinal, e observaram que *ANXA1* estava mais expressa no câncer gástrico do tipo difuso, o que foi comprovado também por análise imuno-histoquímica (WU et al., 2006). Mais recentemente, Gao et al. (2014) também encontraram expressão discretamente reduzida da AnxA1 em câncer gástrico, mas aumentada em outros tipos de tumores gastrointestinais. Ainda em câncer gástrico, constataram uma heterogeneidade na expressão do RNAm, com expressão reduzida nos tumores pobremente diferenciados, enquanto aqueles bem diferenciados e em estágio precoce da doença apresentavam expressão elevada. Contudo, observaram que a proteína é altamente expressa no tecido gástrico normal, sugerindo sua ação na regeneração da mucosa e proteção das células gástricas.

De modo contrário, outros estudos têm mostrado imuno-marcação positiva da AnxA1 tanto em tecido gástrico normal quanto tumoral e que a localização nuclear da proteína em tumores está relacionada com estágio avançado da doença (ZHU et al., 2010). Similarmente Cheng et al. (2012) relacionaram a expressão elevada da AnxA1 com invasão da camada serosa, metástase peritoneal e menor taxa de sobrevida para os pacientes com câncer gástrico. A expressão desta proteína em pacientes com câncer gástrico tem sido relacionada com parâmetros clínico-patológicos como estadiamento TNM (*classification of malignant tumors*) e metástase em linfonodos, sendo utilizada, portanto, como um interessante parâmetro de avaliação do prognóstico para esta neoplasia (ZHANG et al., 2013).

Em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa também se observou alta expressão do RNAm de *ANXA1* em 80% dos casos de câncer gástrico, assim como imuno-marcação positiva no epitélio e estroma, o que também foi encontrado em lesões com potencial pré-canceroso como gastrite crônica, metaplasia intestinal e úlcera gástrica (JORGE et al., 2013; ROSSI et al., 2014).

Recentemente alguns estudos têm mostrado a ação da proteína AnxA1 por meio de

alguns receptores, dentre eles os receptores de formil peptídeo FPR1, FPR2/FPRL1 e FPR3/FPRL2, que são receptores transmembrânicos ligados à proteína G. Estes receptores estão envolvidos na resposta imune inata, inflamação e câncer, atuando na progressão de vários tipos de tumores, inclusive o câncer gástrico (PREVETE et al., 2015). Os FPRs são expressos no epitélio gástrico e são necessários para reparação de úlceras e restituição de integridade da barreira gástrica. Um derivado da bactéria *H. pylori*, Hp (2-20), por meio da interação com FPR1 e FPR2 é capaz de induzir a migração e proliferação celular, bem como a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promovendo, assim, a cicatrização da mucosa gástrica. Estes resultados reforçam novamente a complexa relação entre a bactéria e a mucosa gástrica humana, sugerindo que um sub-produto bacteriano possa ser utilizado para induzir a cicatrização da mucosa gástrica (DE PAULIS et al., 2009).

Ainda para o câncer gástrico, análise imuno-histoquímica de FPR1 mostrou alta expressão do receptor associada à progressão da doença, como estágio IV, invasão da submucosa e serosa e evolução clínica. Em células de adenocarcinoma gástrico a elevação da expressão do FPR1 aconteceu em conjunto com a elevação da Anexina A1, indicando que a regulação por *feedback* positivo está participando na transdução de sinal AnxA1-FPR (CHENG et al., 2014).

Estudo *in vitro*, em linhagem de câncer gástrico possibilitou mostrar um novo mecanismo regulatório de ação da Anexina A1 envolvendo os três receptores (FPR1, FPR2 e FPR3) através da via ERK1/2 e ITGB1BP1, que regula a invasão no câncer gástrico e progressão da doença (CHENG et al., 2012). Mais recentemente, também foi constatado o envolvimento dos receptores FPR1, FPR2 e FPR3 em linhagens de câncer gástrico, em que a ativação de cada receptor induziu a transição epitélio-mesênquima, proliferação, resistência à apoptose e migração. Contudo, experimentos de xenotransplante em camundongos imunocomprometidos com células epiteliais de câncer gástrico silenciadas para os FPRs

mostraram que o silenciamento de FPR1 aumentou o crescimento xenográfico devido ao aumento da densidade de vasos e proliferação celular. Dessa forma sugerindo um papel de FPR1 na inibição da angiogênese em câncer gástrico, podendo representar uma nova abordagem terapêutica para controlar a angiogênese tumoral (PREVETE et al., 2015).

Alguns estudos têm mostrado o envolvimento também de FPR2 em alguns tipos de câncer. Por exemplo, Khau et al. (2011) verificaram o aumento da Annexina A1 associado com proliferação celular em câncer de mama por meio da ativação de FPR1 e FPR2. Em carcinoma de células escamosas de laringe, também foi observado o aumento da proliferação e metástase tumoral via AnxA 1 e FPR2 (GASTARDELO et al., 2014).

Quanto à atuação do FPR2 foi proposto um mecanismo molecular explicando sua dupla natureza, se apresentando como homo ou heterodímero, elucidando o seu papel na diminuição ou ativação da inflamação respectivamente. Também foi constatado que a ligação da AnxA1 atua nesta conformação espacial dos FPRs, o que tem influência direta na ação biológica dos mesmos como pró ou anti-inflamatórios, tornando-os assim também acessíveis para a modulação de drogas com ação exclusivamente anti-inflamatória (COORAY et al., 2013).

Tendo em vista a associação já comprovada entre AnxA1, FPR1 e FPR2 em diversos tipos de câncer, ainda há escassez de estudos em câncer gástrico, são necessárias outras investigações que possam estabelecer estas relações. Os resultados poderão trazer informações importantes que auxiliem no prognóstico mais preciso e possíveis alvos para estratégias terapêuticas para os portadores desta neoplasia. Podemos destacar também os miRNAs que regulam a expressão de genes envolvidos com a inflamação e carcinogênese, atuando nesta forma na compreensão do complexo mecanismo da tumorigênese gástrica.





## *Objetivos*

## II. Objetivos

### II.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a expressão da AnxA1 e dos receptores FPR1 e FPR2 em amostras de adenocarcinoma gástrico, bem como a expressão de miRNAs envolvidos com a carcinogênese gástrica e inflamação (hsa-mir-27a, hsa-mir-196a e hsa-mir-222) que possam regular a expressão do RNAm da *ANXA1*. Posteriormente correlacionar os achados com as características tumorais e clinicopatológicas dos pacientes.

### II.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão da proteína Anexina A1 e dos receptores FPR1 e FPR2 em amostras de adenocarcinoma gástrico;
2. Avaliar a expressão do RNAm dos miRNAs hsa-mir-27a, hsa-mir-196a e hsa-mir-222 e da *ANXA1* nas mesmas amostras e analisar a ocorrência de correlações entre a expressão da *ANXA1* e miRNAs;
3. Investigar a associação entre os resultados da *ANXA1* e miRNAs com às características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes.

*Artigo*



### III. Artigo

#### **Annexin-A1/FPR1 and miR-196a contribute to the pathogenesis of gastric cancer**

Nathália Maciel Maniezzo-Stuchi<sup>1\*</sup>, Ana Flávia Teixeira Rossi<sup>1</sup>, Dalísio de Santi-Neto<sup>2</sup>, Ana Paula Girol<sup>1,3</sup>, Sonia Maria Olini<sup>1</sup> and Ana Elizabete Silva<sup>1</sup>

\*corresponding author: Nathália Maciel Maniezzo Stuchi

UNESP, São Paulo State University, Department of Biology

Rua Cristovão Colombo, 2265

15.054-000 – São José do Rio Preto, SP, Brazil

nmmbiomedica@hotmail.com

<sup>1</sup> UNESP, São Paulo State University, Department of Biology, São José do Rio Preto Campus, SP, Brazil

<sup>2</sup> Hospital de Base, Legal Medicine Department and Pathology Service, São José do Rio Preto, SP, Brazil

<sup>3</sup> FIPA, Integrated College Padre Albino Foundation, Department of Physical and Biological Sciences, Catanduva, SP, Brazil

## Abstract

**Background:** Gastric cancer remains an important cause of mortality worldwide, and its relationship with inflammatory process has been explored, as the role of Annexin A1 (AnxA1) anti-inflammatory protein and the formil peptide receptors (FPRs), related to the initiation and malignant progression. miRNAs (endogenous non-coding RNAs) also play an important role in inflammatory and carcinogenic processes. Thus, the aim of this study was to evaluate the relationships among AnxA1, FPR1 and FPR2 receptors, and miRNAs involved in gastric carcinogenesis and whether *ANXA1* expression is mediated by miRNAs.

**Methods:** mRNA expression of miRNAs (miR-27a, miR-196a and miR-222) and *ANXA1* were quantified by real time PCR, for 31 samples of gastric adenocarcinoma and adjacent normal and/or metaplastic areas. For the same samples, AnxA1, FPR1 and FPR2 protein expression were evaluated by immunohistochemical and densitometry analysis. Clinicopathological features of patients and disease's status were compared to miRNAs and *ANXA1* expression. Statistical analysis were performed with software GraphPad Prism 5 and values  $p \leq 0.05$  were considered significant.

**Results:** Significant differences were found in the mRNA expression of miR-196a ( $p < 0.001$ ) and *ANXA1* ( $p < 0.001$ ) comparing tumor area *versus* normal pool, which were up regulated in gastric cancer samples, while miR-27a showed no significant change and miR-222 were down regulated ( $p = 0.01$ ). In addition, miR-196a and its target *ANXA1* were inversely correlated ( $r = -0.55$ ;  $p = 0.003$ ) to gastric cancer. Immunoexpression of AnxA1 and FPR1 were widely diffused in metaplastic and gastric tumor tissues, and they were positively correlated both in epithelium ( $r = 0.87$ ;  $p < 0.0001$ ) and stroma ( $r = 0.62$ ;  $p = 0.004$ ) of gastric tumors, while FPR2 was not expressed.

**Conclusions:** Our findings highlight the AnxA1/FPR1 signaling pathway in gastric carcinogenesis and evidence for the first time the relationship between *ANXA1*:miR196a suggesting which may be modulated by miR196a in this neoplasia. Consequently opening up

possibilities for future research, which could potentially be applied as a therapeutic indicator of gastric cancer.

**Key-words:** Annexin A1, FPR1, FPR2, miR-27a, miR-196a, miR-222, gastric cancer.

## Background

Gastric cancer occupies the third place in cause of cancer death worldwide and fifth in incidence [1]. Despite the decline of this pathology [2] it is estimated that about 780,000 people die each year because of this neoplasia [3]. In Brazil, the Cancer National Institute estimates to 2016, 7,600 cases among women and 12,920 among men, ranking fourth place in incidence and second in death [4].

The gastric adenocarcinoma is the most prevalent and histologically classified in intestinal and diffuse types [5], where intestinal type can progress from transition of normal mucosa to chronic superficial gastritis, atrophic gastritis and intestinal metaplasia, and finally to dysplasia and adenocarcinoma [6, 7].

There is a strong association between chronic inflammation and the gastric cancer, as a consequence of the infection by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), which activates various inflammatory mediators and genetic and epigenetic mechanisms [8]. Chronic inflammation may lead to tumorigenesis through the DNA damage caused by reactive oxygen and nitrogen species, activation of the immune and inflammatory response leading to increased cell proliferation, stimulating metastasis and angiogenesis [9, 10]. An important protein involved in various inflammatory diseases and cancer is Annexin A1 (AnxA1) [11]. This protein is described as anti-inflammatory and belongs to a family of 13 proteins found in mammals [12, 13] it is able to bind to calcium and membrane phospholipids, besides the anti-inflammatory action. AnxA1 also has an antiproliferative activity [14]. Among other functions are highlighted cell growth, membrane fusion, endocytosis and exocytosis, signal transduction, cytoskeleton formation, keratinocyte differentiation and apoptosis [15-17]. Changes in the expression and location of this protein have been described in various types of cancers such as, breast, esophagus, prostate and stomach, and it is also correlated with tumor progression



and survival [17, 18]. We have recently observed increased expression of this protein and mRNA in lesions of progression cascade of gastric cancer, as chronic gastritis, intestinal metaplasia, gastric ulcer and also in the gastric cancer [19, 20], evidencing their involvement in the early stages of gastric carcinogenesis.

Functional studies have demonstrated the connection between AnxA1 protein and some receptors, including Formyl Peptide Receptors (FPRs), as FPR1, FPR2, and FPR3, which are transmembrane G protein coupled receptors [21, 22]. AnxA1 and FPR2 were responsible for increasing proliferation and metastasis in laryngeal squamous cells carcinoma [23], and together with FPR1, promoting cell proliferation in breast cancer [17]. The AnxA1 - FPR1 relationship was associated to keratinocyte death in severe cutaneous adverse drug reaction [24], and it was found increased expression of both in endometrial lesions [25].

In gastric cancer some findings indicated that FPR1 and FPR2 were in charge of wound repair and maintenance of gastric barrier, after indomethacin-induced injury [26]. Although FPRs are also related to invasion and metastasis as well [21], FPR1 has a tumor suppressor function by inhibiting angiogenesis, when it is silenced in gastric cancer cells and enhanced xenograft growth in immunocompromised mice, enhancing vessel density and cell proliferation [22]. A positive feedback in AnxA1-FPR1 signal transduction has also been described as regulated by FPR1, and its up regulation was associated to stage IV disease, submucosal invasion, serosal invasion, and clinical outcome of gastric cancer [27].

Another key component that acts in the carcinogenic process and inflammation are microRNAs (miRNAs), which play a key role in post-transcriptional gene regulation [28], in order to influence biological processes as proliferation, invasion, metastasis and resistance to apoptosis by modulating the expression of mRNA targets [29]. Dysregulated expression of miRNAs has been reported in gastric cancer, some of which acting as oncogenes as miR-9, miR-18a, miR -27a, miR-196a, miR-222, miR-223 or tumor suppressors such as let-7b, miR-

148a, miR-370, miR-409, miR-625 [30-33], so with potential to be used as candidate biomarkers for diagnostic, prognostic and treatment response of gastric cancer [31, 34-37]. The repression of the miR-27a could inhibit cell proliferation and resistance to chemotherapy in gastric cancer cells [38], indicating this miRNA as a biomarker to predict the prognosis and chemosensitivity in recurrent or metastatic gastric cancer [39]. The miRNA 196a and b variants have been correlated with invasion and metastasis in gastric cancer [40-42], and some of them, such as miR-222 and miR-223, are considered to be plasma markers for this malignancy [43].

Interestingly the miR196a was reported to target mRNA of *ANXA1* in esophageal adenocarcinoma and different cancer cell lines, such as esophageal, breast and endometrial [44]. More recently, it was observed that the miR-196a targets *ANXA1* mRNA to inhibit VEGF (vascular endothelial growth factor) -mediated cell migration and angiogenesis in HEK293T and HUVEC cell lines, thus strengthening the role of miR-196a in the post-transcriptional regulation of this gene [45]. However, there are no studies in gastric cancer showing this relationship.

Considering the important role of AnxA1 and of the FPRs in the initiation and tumoral progression, as well as miRNAs which regulates important biological processes, this study aimed at investigating whether annexin-A1/ FPR1 and FPR2 receptors and miRNAs are dysregulated in gastric cancer and whether *ANXA1* expression is mediated by miRNAs. Thus, we selected through public database the oncomirs miR-27a, miR-196a and miR-222 [46, 47] involved in gastric carcinogenesis to investigate its potential role in the modulation of this anti-inflammatory protein expression, which may indicate new therapeutic targets for gastric cancer. Our data showed increased expression of AnxA1/FPR1 and only the miR-196a dysregulated and inversely correlated with *ANXA1* levels in gastric cancer samples.

## Methods

### Clinical Samples

Analyses of *ANXA1* and miRNAs expression from archived formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) gastric cancer resection specimens were approved by the Ethics Committee in Research (CEP-UNESP-IBILCE, number: 122.117/2012). 31 FFPE-gastric cancer tissue blocks were selected from Hospital de Base – São José do Rio Preto- SP, Brazil, Service of Pathology files between 2010 and 2013. The cases were histopathologically classified according to Laurén [5] as intestinal type (14 cases) and diffuse type (17 cases) by pathologist. We selected patients with gastric cancer who have undergone partial or total gastrectomy, and who did not previously use radiotherapy or chemotherapy. After hematoxylin and eosin (H & E) staining, the slides were reviewed by pathologist who outlined tumor and adjacent normal and metaplastic areas. Clinicopathological (age, gender, tumor histologic type, TNM stage, tumor size and *H. pylori* diagnosis) data were collected according to medical records.

### RNA isolation from FFPE (formalin-fixed paraffin embedded)

RNA was previously isolated from the dissected FFPE sections using the RecoverAll™ kit (Ambion) according to the manufacturer's protocol. Five sections of 10µm from blocks of each tumor and adjacent normal or metaplastic areas were performed. Slides were placed in xylene at high temperature (50 to 80 ° C), washed with absolute alcohol for complete removal of paraffin. Afterwards, these samples were placed in tubes with separation columns, which were washed with buffer solutions of the kit: once with Wash 1 solution (700ul), and twice to Wash 2/3 solution (500ul). At the end of the process 60 µL of elution buffer were added to the column, and after centrifugation at 12000 rpm for 1 minute and total RNA was stored at -80°C. Concentration, purity and integrity for the RNA were determined by NanoDrop

ND1000 spectrophotometer (Uniscience).

### **mRNA of *ANXA1* and microRNA expression by quantitative real-time PCR (qPCR)**

After RNA extraction, Reverse Transcription (RT) reaction for *ANXA1* was done using the High Capacity cDNA Archive Kit (*Applied Biosystems*) and the synthesis of complementary DNA (cDNA) to the miRNAs with TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystems*), both according to the manufacturer's protocol.

The qPCR reactions were performed in *StepOnePlus Real Time PCR System 2.2.3* (*Applied Biosystems*), using specific TaqMan® probe for *ANXA1* (Hs00167549\_m1) (*Applied Biosystems Inc*) and reference gene *ACTB* (Catalog#: 4352935E) validated in gastric tissue samples in previous studies [48, 49], and for miRNAs hsa-mir-27a-3p (*assay id*: 408), hsa-mir-196a-5p (*assay id*: 241070\_mat) and hsa-mir-222-3p (*assay id*: 2276) and for controls RNU6B (Hs001093) and RNU48 (Hs001006) (*Applied Biosystems Inc*). A pool (22 samples) of adjacent normal samples was used as the calibrator for the reactions. All reactions were performed in duplicate, in case of deviation between the replicas, the reactions were repeated in triplicates.

Relative quantification (RQ) of mRNA and miRNA was obtained according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method proposed by Livak & Schmittgen (2001) [50]. The RQ was expressed as median (range).

### **Immunohistochemistry for Annexin A1, FPR1 and FPR2 proteins**

Endogenous AnxA1, FPR1 and FPR2 immunostaining were assessed by histological sections (4µm) in each sample (tumor, adjacent normal and metaplastic areas). After deparaffinization, sections were rehydrated in graded ethanol (80, 80 and 50%). For antigen

retrieval, they were incubated in citrate buffer solution. It was used primary polyclonal rabbit anti-AnxA1 (Zymed Laboratories), anti-FPR1 and anti-FPR2 (Bioss) at concentrations of 1:1000 in 1% BSA-bovine serum albumin. Some sections were incubated with 1% BSA instead of the primary antibody to provide a negative control for the reaction. After the incubation period, they were subjected to incubation with biotinylated anti-rabbit LSAB commercial kit (Dako). Subsequently, the sections were incubated as Peroxidase Conjugated Streptavidin Complex. The slides were revealed in the dark with 3,3'-diaminobenzidine (DAB - DAB kit - Invitrogen). Harris hematoxylin was used as a counterstain. The sections were dehydrated in ethanol, bathed in xylene for mounting with Balsam of Canada. For the densitometry analysis, the sections were photographed at objective x20 (three fields per slide) and using ZEISS microscope - Axioskop 2 with the AxioVision software, on an arbitrary scale from 0 to 255, and the data were expressed as the mean  $\pm$  SEM. The analyzes were performed with the assistance of the software GraphPad Prism 5. For each sample were evaluated cytoplasm of epithelial cell and stroma in 60 points distributed equally in each of these regions.

### Statistical Analysis

All outliers were removed before data analysis using the box-plot graphic method [51]. The distribution of continuous data was evaluated using the D'Agostino & Pearson normality test. Wilcoxon Signed Rank test was used to rate up or down regulation expression of tumor area *versus* normal pool, the normal pool was used as calibrator in  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  method [50]. The association of *ANXA1* and miRNAs expression with clinicopathological parameters was performed by Mann-Whitney test. The correlation between the expression of mRNA of *ANXA1* and miRNA in tumor tissue was analyzed using Spearman's Correlation, while the correlations between the expression of AnxA1 and FPR1 in epithelium and stroma of tumoral tissue were analyzed using Pearson's Correlation. ANOVA and Bonferroni's post-test were used to evaluate densitometry analysis. Values  $p \leq 0.05$  were considered significant.

## Results

### **mRNA expression of *ANXA1* and miR-27a, miR-196a and miR-222**

The individual expression profiles of mRNA of *ANXA1*, miR-27a, miR-196a and miR-222 are presented in Figure 1 (additional file 1). It was possible to observe that *ANXA1* relative expression was slightly higher in tumor area (RQ=1.37;  $p<0.001$ ) in comparison to normal pool (RQ= 1.0), as well as with metaplastic area (RQ= 0.79;  $p=0.03$ ). miR-196 was significantly upregulated comparing tumor area (RQ= 16.99;  $p<0.001$ ) and metaplastic area (RQ= 4.78;  $p=0.016$ ) *versus* normal pool, while miR-222 was decreased in tumor area compared to normal pool (RQ= 0.69;  $p=0.01$ ). However, there was no significant difference in miR-27a, which showed basal expression. In addition, the correlation analysis between mRNA levels of *ANXA1* and each miRNA showed significant inversely correlation only between *ANXA1* and miR-196a ( $r= -0.55$ ;  $p=0.003$ , Table 1 and Figure 2) in the gastric tumor, evidencing that while mRNA expression of miR-196a increased *ANXA1* expression level was decreasing.

### **Association between mRNA expression of *ANXA1* and miRNAs with clinicopathological parameters**

Several clinicopathological parameters as tumor histological type, tumor TNM stage and tumor size and age, gender were evaluated with the relative expression levels of *ANXA1* and miRNAs (Table 2), but no association was observed except to mRNA expression of miR-196a and gender that was significantly increased in female ( $p=0.01$ ). It has not been possible to correlate the expression of *ANXA1* and miRNAs to the diagnosis of *H. pylori*, because 22 individuals were negative, 1 was positive and for 8 this data was not available.

### **AnxA1, FPR1 and FPR2 proteins expression in gastric tissue**

AnxA1 and FPR1 immunostaining in gastric mucosa were increasing from normal mucosa to gastric cancer. The expression of both protein and receptor in the epithelium and stroma of normal mucosa was weak, moderate in metaplasia and strong immunostaining in diffuse-type and intestinal-type adenocarcinoma (additional file 2, 3). There was absence of immunostaining for FPR2 in adjacent normal, metaplastic and tumor tissues (Figure 4E).

Densitometry analysis showed increased expression of both AnxA1 and FPR1 immunostaining for epithelium and stroma for diffuse-type adenocarcinoma (Figure 3C, 4B) and intestinal-type adenocarcinoma (Figure 3D, 4C) in comparison to adjacent normal tissues, which was reduced for epithelium and stroma (Figure 3A, 4A). For metaplastic area moderate expression was observed in epithelium and stroma (Figure 3B, 4A).

AnxA1 and FPR1 were positively correlated in gastric tumors both in epithelium ( $r=0.87$ ;  $p<0.0001$ ) and stroma ( $r=0.62$ ;  $p=0.004$ ).

### **Discussion**

In this study, we investigated whether the expression of AnxA1/FPR1 and FPR2 and miRNA are dysregulated in gastric cancer, and whether the mRNA of *ANXA1* may be modulated by miRNAs. Our findings showed increased expression of AnxA1/FPR1 proteins positively correlated and miR-196a inversely correlated to *ANXA1* levels suggesting that this miRNA might regulate post transcriptionally the mRNA of *ANXA1*. However, we did not observe association between the expression levels of *ANXA1* and miRNAs with clinicopathological characteristics, except for the miR-196a levels, which were associated to female gender.

AnxA1 is a protein that takes part actively in the modulation of processes involving inflammation, cell growth, membrane fusion, signal transduction, apoptosis, and resistance to

drugs [14-16, 52]. Although this protein is involved in the carcinogenic process in different types of cancer [17, 18] and participation in the early stages and progression of gastric cancer [53], as well as correlation between high expression in gastric cancer and clinicopathological parameters [54], its relationship with gastric cancer remains controversial. We could observe a discrete increase in mRNA of *ANXA1* and overexpression of this protein and FPR1 receptor in gastric cancer samples.

Previously, we reported increased mRNA and protein expression of AnxA1 and Galectin-1 during the progression cascade of gastric cancer, as chronic gastritis, intestinal metaplasia, gastric ulcer and gastric adenocarcinoma [19, 20]. Gao et al., (2014) [55] found the opposite relationship, an increase of *ANXA1* expression in normal gastrointestinal tissue and down regulation in esophageal, gastric and bile duct cancer, but up regulation in pancreatic cancer. They also observed cell growth inhibition and up regulation of COX-2 (*cyclooxygenase-2*), when *ANXA1* expression was induced in gastric cancer cells. Thus, AnxA1 seems to be a very specific marker of cell differentiation for different diseases and it may vary even for the distinct stages of the same disease, suggesting its actions depend on the cellular location of protein [56], as well as which protein residue is phosphorylated, since the protein activity appears to differ according to phosphorylation and its subsequent conformational change [57].

This protein may be expressed, therefore, in both normal and tumor gastric tissue, as found, with positive immunostaining in 69.2% of normal gastric tissues and 45.2% of tumor tissues [53]. Our results show a progressive immunostaining to this protein and FPR1 receptor, with discrete immunostaining in normal gastric tissue, moderate in metaplastic tissue and strong in tumor, regardless of histological type, TNM stage and tumor size.

It is well known that extracellular form of AnxA1 interacts with formyl peptide receptors (FPRs), to promote invasion and metastasis [58]. In humans, three types of FPRs



receptors are found: FPR1, FPR2 and FPR3, which are transmembrane receptors, related to the G protein, which are involved in modulating the innate immune response, inflammation and cancer [22]. The FPRs binding to the AnxA1 may present in the form of homo- or heterodimer, which interferes directly on its biological action causing induction or inhibition of inflammation, as well as in the transduction of pro-apoptotic signals [59].

AnxA1/FPR2 relationship was observed in human laryngeal squamous cell carcinoma [23] and in arthritis [60], and AnxA1/FPR1/FPR2 on pancreatic carcinoma cells [61]. For gastric cancer all FPR1, FPR2 and FPR3 were related to AnxA1. The individual silencing of FPRs attenuated the invasion of gastric cancer cell [21]. However, the signal regulation process of AnxA1 in gastric cancer appears to be mainly related to FPR1, as demonstrated by recent studies [22, 27]. CHENG et al. (2014) [27] showed up regulation of this receptor associated to submucosal invasion and serosal invasion and stage IV of gastric cancer implying a positive feedback to AnxA1-FPR1. This result is consistent with our findings for high FPR1 expression in both epithelium and stroma of gastric cancer correlated with AnxA1 expression.

In addition, microRNAs are being extensively researched in cancers in an attempt to identify novel molecular marker and its target genes for better earlier diagnosis and prognosis. Aberrant expression of miRNAs in gastric cancer has been associated to inflammation grade, presence of *H. pylori* in gastric mucosa, histological types of gastric cancer, and it plays an important role in sensibility and resistance to drugs [33, 62].

In our study, the oncomir miR-27a showed no dysregulation in gastric cancer samples and miR-222 was down regulated. miR-27a has been reported to be changed in some types of cancer as up regulated in breast cancer [63] and in osteosarcoma, which is related to TNM stage, tumor grade and distant metastasis [64], and down regulated to non-small cell lung cancer [65]. In gastric cancer, increased expression has been associated to lymph node

metastasis [33] and, recently, this miRNA was regarded as a plasma marker for gastric cancer [66].

The miR-222 has an oncogenic role in some cancers such as colorectal cancer, pancreatic duct cancer and gastric cancer [67]. This miRNA is associated to cell growth and invasion in gastric cancer [68] by targeting *RECK*, a tumor suppressor gene [69], *PTEN*, a regulator of protein phosphatases and 3'-phosphoinositol phosphatases [70] and *VGLL4*, a transcriptional repressor involved to overgrowth and tumorigenesis [71], so may have an important role in the initiation and progression of gastric cancer. In contrast, for our samples of gastric cancer it was down regulated, but various studies usually associate the expression of miR -222 with miR-221, as together they target a gene cluster and act synergistically as oncogenes, and their activation is also related to the presence of *H. pylori* [67, 68] . In our study, miR-222 was assessed individually, and most patients were not infected with the bacteria, perhaps for these reasons we have not found the same association with the disease.

Interestingly we have observed up regulation of miR-196a in gastric cancer samples inversely correlated with *ANXA1* levels, as well as in the adjacent metaplastic area. Previous studies have reported aberrant expression of this miRNA for colorectal cancer [72] and gastric cancer involved in cell proliferation [73, 74]. miR-196a has been considered a biomarker for gastric cancer since early stages of this disease [31]. Moreover, the miR-196a was the one that showed association to gender, higher expression in females, but the influence of gender in changes in the expression of this miRNA has not been reported in the literature. However, it is possible that female hormone, as estrogen, can interfere in this process, since polymorphisms in this miRNA are considered potential diagnostic biomarkers for patients with early breast cancer that express hormone receptors [75]. miR-196a also targets *HOXB7* and it physically interacts with the estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) leading to endocrine resistance in breast cancer cells [76]. In addition, VEGF is also a validated target of miR-196a, and this growth

factor is essential for endometrial repair, so its levels are constantly changing according to the phase of the menstrual cycle [77].

The miR-196a regulates the expression of important genes involved with embryogenesis and oncogenesis, since it is located in intergenic region of *HOX* gene clusters [78]. Hao et al., (2015) [79] found that miR-196a target *HOXB8* and caspase-3 interfering in apoptosis, migration and proliferation in hepatocellular carcinoma cells. miR-196a was recently correlated with poor prognosis in ovarian carcinoma [80] and associated to aggressive clinicopathological features of high-grade glioma [81]. The inhibition of miR-196a was capable of reversing cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell line [82]. All together, these findings reinforce the involvement of miR-196a in the carcinogenic process and its potential as a prognostic marker and therapeutic target.

Another important validated target of mir-196a is *ANXA1*, which has been previously described in cell lines of esophageal, breast and endometrial cancer [44], and different head and neck cancer cell lines [83]. However, our study is the first that found this correlation also in gastric cancer. mRNA of *ANXA1* is a validated target of miR-196a, according the Diana Tools, Tarbase and MiRTarBase database [46, 47]. Pin et al., 2012 [45] described *ANXA1*:miR-196 relationship as regulated by VEGF. miR-196a binds to 3'UTR *ANXA1* mRNA to repress its expression. *ANXA1* is a required mediator of VEGF-induced cell migration. The possible mechanism that explains the interaction of miR-196a is that it is an angiogenic switch, and it is important to control *ANXA1* expression, since this protein is necessary in the p38/MAP Kinase pathway, a crucial regulator of endothelial cell migration in response to VEGF. *ANXA1* is phosphorylated by LIM kinase, which influences p38 MAP kinase pathway, so *ANXA1* is involved in the formation of lamellipodia to sustain cell migration, since lamellipodia confers forward movements to endothelial cells during their migration. Thus miR-196a could be down regulated to facilitate migration and angiogenesis

via VEGF by an up regulation of *ANXA1*, being this relationship flexible and modulated by tumor growth [45].

Recently, the opposite relationship was also reported, ie, *ANXA1* regulating miRNAs in breast cancer cells, as miR-26b\* and miR-562 that target canonical NF-kB pathway inhibiting its expression, due to the constant activation of NF-kB by AnxA1. This influences wound healing and tumor-induced, since they have been shown to regulate endothelial cell tube formation in MCF7 cells, which relates to angiogenesis. Thus, *ANXA1* can regulate transcription factors, downstream gene activation, and regulate microRNA expression [84].

Although the correlation between miR-196a and *ANXA1* have not been confirmed by functional studies, our findings together with the literature indicate that *ANXA1* mRNA can be post-transcriptionally regulated by miR-196a, involving complex interaction networks in the carcinogenic process. These results highlight *ANXA1* and miR-196a as possible molecular markers and therapeutic targets since the AnxA1 is listed as one potential therapeutic drug for inflammatory disease and cancer treatment [85], and miRNA-based therapies can reduce aggressiveness in gastric cancer cells and sensitize them to conventional chemotherapeutic agents [86].

## Conclusions

Our findings emphasize the AnxA1/FPR1 signaling pathway in gastric carcinogenesis, which open up possibilities for future studies of new anti-cancer drugs, since they are applicable pharmacological targets. Moreover, it highlights for the first time the relationship between *ANXA1*: miR196a suggesting that it may be modulated by miR196a also in this neoplasia.

## Abbreviations

***ANXA1***: Annexin A1; **BSA**: Bovine serum albumin; **CEP**: Ethics Committee in Research; ***COX-2***: Cyclooxygenase-2; **DAB**: 3,3'-diaminobenzidine; **DNA**: Deoxyribonucleic acid;

**FFPE:** Formalin-fixed paraffin embedded; **FPR1:** Formyl peptide receptor 1; **FPR2:** Formyl peptide receptor 2; ***H. pylori:*** *Helicobacter pylori*; ***HOX:*** Homeobox; ***HOXB8:*** Homeobox B8; **µm:** Micrometers; **µL:** Microliters; **miR:** MicroRNA, **miRNA:** *PTEN:* Phosphatase and tensin homolog ;**qPCR:** Quantitative polymerase chain reaction; ***RECK:*** Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs; **RNA:** Ribonucleic acid; **RQ:** Relative quantification; **RT:** Reverse transcription; ***VEGF:*** Vascular endothelial growth factor; **°C:** Celsius degree.

### Competing Interests

The authors declare no competing interests.

### Author's Contributions

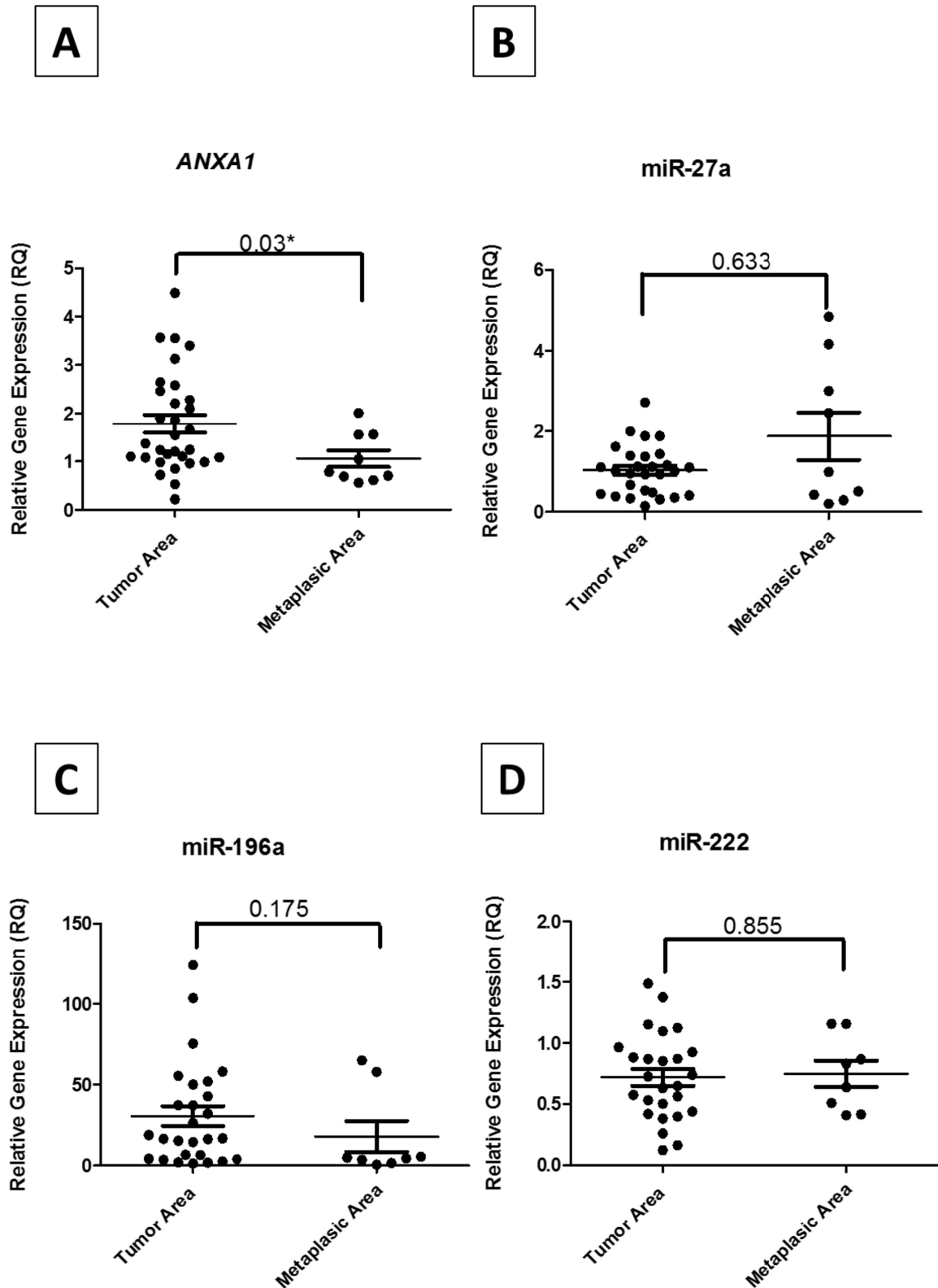
Substantially developed study design and experimental setup: NMMS, SMO and AES. Samples collection and subsequent processing: NMMS. microRNA and *ANXA1* quantification, analysis and data collection: NMMS and AFTR. Immunohistochemistry and densitometry analysis: NMMS, SMO, APG and DSN. Statistical analysis: NMMS and AFTR. Composed and critically revised the final manuscript: NMMS, SMO, and AES. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

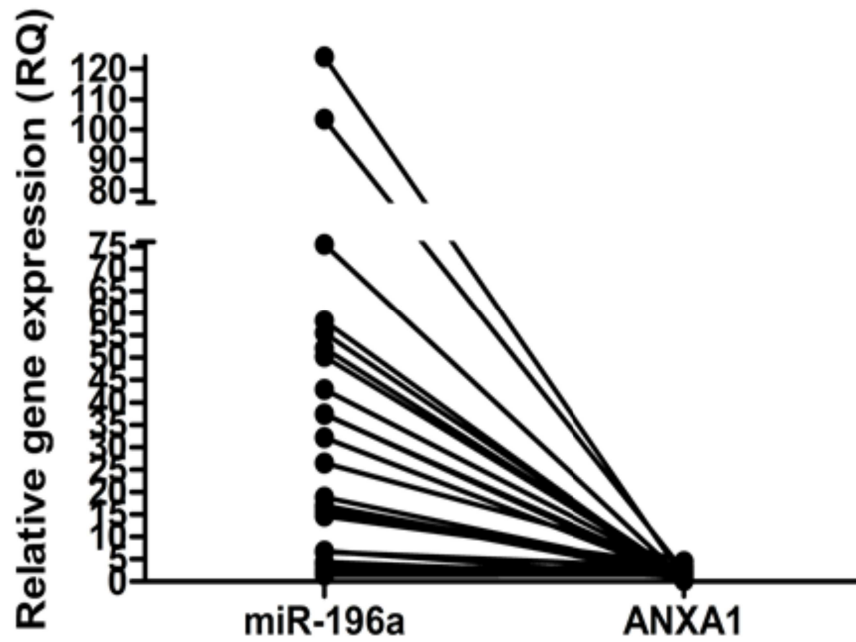
We thank CAPES for granted scholarship. We thank Marina de Paula Silva, Marystela Fávero de Oliveira Cardoso, and Sara de Souza Costa for technical assistance in immunohistochemistry, and Joice Matos Biselli Périco for statistical assistance.

**Funding**

This research was partially supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, process number 2012/15036-8 to AES and 2012/21603-2 to SMO) and CNPq (process number 474776/2013-1 to AES and 308144/2014-7 to SMO).

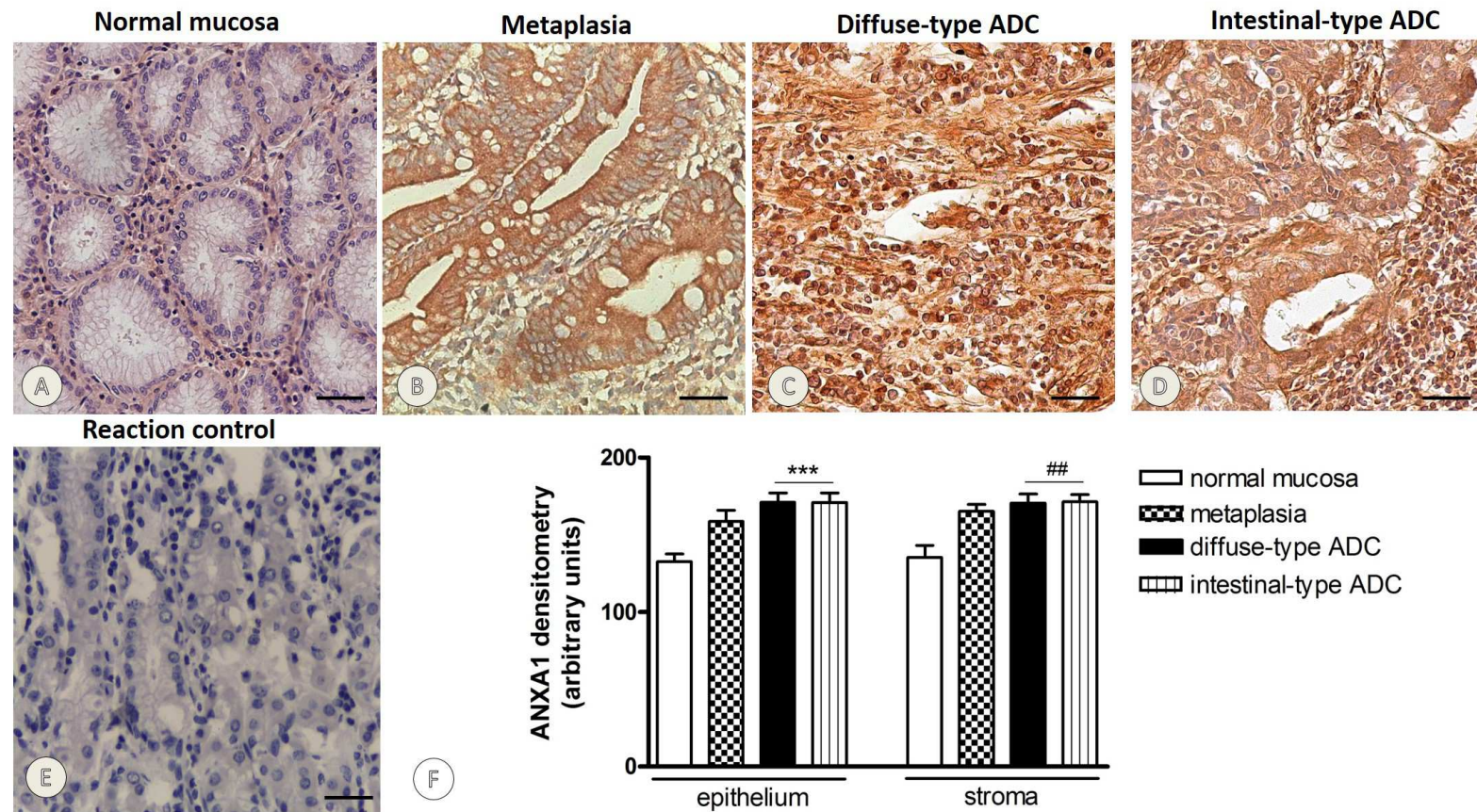


**Figure 1:** Relative expression levels of *ANXA1* (A), miR-27a (B), miR-196a (C) and miR-222 (D) in gastric cancer *versus* adjacent metaplastic tissue. Data were normalized with adjacent normal tissue pool and *ACTB* reference gene and data are presented in RQ (relative quantification) values, each point represents one sample. Line symbolizes median RQ for each group. p - value: the Mann Whitney Test; \* significant difference.



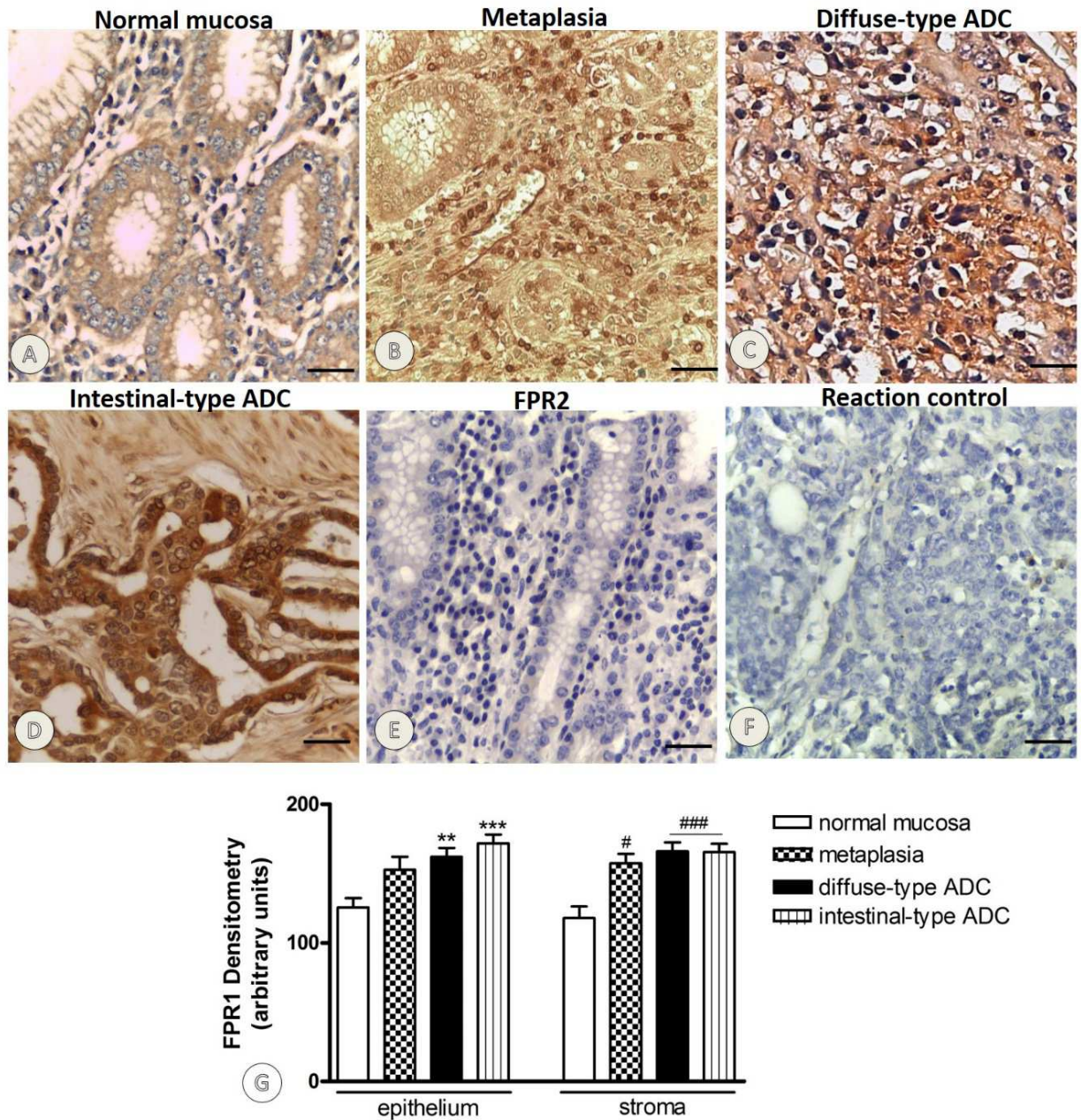
**Figure 2:** Relationship between mRNA relative expression of miR-196a and *ANXA1* showing high expression of miR-196a and low expression of *ANXA1*, in gastric cancer samples. Each point represents a sample, which is correspondingly connected. RQ (relative quantification).





**Figure 3:** AnxA1 expression in gastric mucosa. Weak immunoreactivity in the epithelium and stroma of adjacent normal tissue (A). Moderate expression in adjacent metaplastic tissue (B). Intense expression in diffuse-type adenocarcinoma (C) and intestinal-type adenocarcinoma (D). Absence of immunostaining in the reaction control (E). Sections: 5  $\mu$ m. Counterstaining: hematoxylin. Scale bars, 20 $\mu$ m. Densitometry analysis of AnxA1 (F). Data represent the mean  $\pm$  SEM of densitometry index. \*\*\*p < 0.001 *versus* normal epithelium; ##p < 0.01 *versus* normal stroma.





**Figure 4:** FPR1 expression in gastric mucosa. Modest immunoreactivity in adjacent normal tissue (A). Intense epithelial and stromal expression in adjacent metaplastic tissue (B), diffuse-type adenocarcinoma (C) and intestinal-type adenocarcinoma (D). Absence of immunostaining for FPR2 (E) and the reaction control (F). Sections: 5 $\mu$ m. Counterstaining: hematoxylin. Scale bars, 20 $\mu$ m. Densitometry analysis of FPR1 (G). Data represent the mean  $\pm$  SEM of densitometry index. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01 *versus* normal epithelium; ###p < 0.001, #p < 0.05 *versus* normal stroma.

**Table 1:** Correlation coefficient of mRNA expression levels among *ANXA1* and miRNAs.

|                         | <b>Correlation coefficient (r)</b> | <b>p Value</b> |
|-------------------------|------------------------------------|----------------|
| <i>ANXA1</i> x miR-27a  | 0.07                               | 0.723          |
| <i>ANXA1</i> x miR-196a | -0.55                              | 0.003*         |
| <i>ANXA1</i> x miR-222  | -0.21                              | 0.308          |

r= Correlation coefficient; p – value: Spearman’s correlation; \* significant difference

**Table 2:** Relative expression levels of *ANXA1*, miR-27a, miR-196a and miR-222 according to clinicopathological and demographic characteristics of gastric cancer patients.

| Characteristics        | <i>ANXA1</i><br>N(31) | miR-27a N(31) | miR-196a<br>N(29) | miR-222 N(30) |
|------------------------|-----------------------|---------------|-------------------|---------------|
| <b>Age</b>             |                       |               |                   |               |
| <60                    | 12 (39%)              | 12 (39%)      | 11(38%)           | 12 (40%)      |
| RQ median              | 1,13                  | 1.06          | 14.61             | 0.58          |
| Range                  | (0.21-3.57)           | (0.41-2.0)    | (2.13-123.9)      | (0.26-0.97)   |
| ≥60                    | 19 (61%)              | 19 (61%)      | 18 (62%)          | 18 (60%)      |
| RQ median              | 1.66                  | 0.98          | 29.32             | 0.85          |
| Range                  | (0.53-4.49)           | (0.15-2.72)   | (1.46-103.5)      | (0.12-1.49)   |
| p Value                | 0.216                 | 0.518         | 0.445             | 0.254         |
| <b>Gender</b>          |                       |               |                   |               |
| Female                 | 9 (29%)               | 9 (29%)       | 7 (24%)           | 8 (27%)       |
| RQ median              | 1.66                  | 1.11          | 50.58             | 0.69          |
| Range                  | (0.53-3.40)           | (0.15-1.88)   | (16.53-123.9)     | (0.38-1.15)   |
| Male                   | 22 (71%)              | 22 (71%)      | 22 (76%)          | 22 (73%)      |
| RQ median              | 1.31                  | 0.99          | 15.46             | 0.68          |
| Range                  | (0.22–4.49)           | (0.34-2.72)   | (1.46-75.46)      | (0.12-1.49)   |
| p Value                | 0.68                  | 0.94          | 0.01*             | 0.879         |
| <b>Histologic Type</b> |                       |               |                   |               |
| Intestinal             | 14 (45%)              | 14 (45%)      | 14 (48%)          | 14 (46%)      |
| RQ median              | 1.10                  | 1.03          | 16.49             | 0.73          |
| Range                  | (0.22-4.49)           | (0.15-2.72)   | (1.46-75.46)      | (0.26-1.49)   |
| Diffuse                | 17 (55%)              | 17 (55%)      | 15 (52%)          | 16 (54%)      |
| RQ median              | 1.90                  | 1.02          | 25.52             | 0.65          |
| Range                  | (0.53-3.57)           | (0.31-2.0)    | (1.94-123.9)      | (0.12-1.38)   |
| p Value                | 0.071                 | 0.659         | 0.452             | 0.798         |
| <b>TNM Stage</b>       |                       |               |                   |               |
| 0 / I                  | 8 (26%)               | 8 (26%)       | 5 (16%)           | 7 (23%)       |
| RQ median              | 1,65                  | 1,50          | 37,38             | 0,65          |
| Range                  | (0,53-3,40)           | (0,31-2,72)   | (1,46-52,05)      | (0,38-1,13)   |
| II / III/ IV           | 23 (74%)              | 20 (65%)      | 22 (71%)          | 19 (61%)      |
| RQ median              | 1,38                  | 0,97          | 16,76             | 0,73          |
| Range                  | (0,22-4,49)           | (0,15-1,62)   | (1,94-123,9)      | (0,12-1,49)   |
| p Value                | 0,875                 | 0,089         | 0,779             | 1,000         |
| <b>Tumor Size</b>      |                       |               |                   |               |
| ≤ 5cm                  | 22 (71%)              | 19 (61%)      | 18 (58%)          | 20 (65%)      |
| RQ median              | 1,31                  | 1,1           | 16,74             | 0,69          |
| Range                  | (0,22-4,49)           | (0,31- 2,72)  | (1,459-123,9)     | (0,12-1,49)   |
| >5cm                   | 8 (26%)               | 8 (26%)       | 8 (26%)           | 6 (20%)       |
| RQ median              | 1,98                  | 0,75          | 34,54             | 0,68          |
| Range                  | (0,96-2,47)           | (0,15-1,612)  | (6,624-103,5)     | (0,44-1,15)   |
| p Value                | 0,907                 | 0,232         | 0,233             | 0,738         |

RQ= Relative Quantification; p – value: Mann-Whitney Test; \* significant difference.

**Additional File 1:** Relative expression of *ANXA1*, miR-27a, miR-196a and miR-222 in metaplasia and tumor area *versus* normal pool and metaplasia *versus* tumor area.

| RQ=                                   | Relative<br>value: Wilcoxon<br>the Mann Whitney<br>tumor) * significant | <hr/>               |                 | Quantification; p –<br>Signed Rank Test;<br>Test (metaplasia x<br>difference |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------|
|                                       |                                                                         | Metaplasia<br>N (9) | Tumor<br>N (31) |                                                                              |
| <hr/>                                 |                                                                         |                     |                 |                                                                              |
|                                       |                                                                         | <b>Anxa1</b>        |                 |                                                                              |
|                                       |                                                                         | N                   | 9               | 31                                                                           |
|                                       |                                                                         | RQ median           | 0.787           | 1.374                                                                        |
|                                       |                                                                         | Range               | 0.560 - 2.01    | 0.218 - 4.491                                                                |
|                                       |                                                                         | p value             | 0.743           | <0.001*                                                                      |
|                                       |                                                                         |                     |                 | 0.03*                                                                        |
| <hr/>                                 |                                                                         |                     |                 |                                                                              |
|                                       |                                                                         | <b>miR-27a</b>      |                 |                                                                              |
|                                       |                                                                         | N                   | 9               | 31                                                                           |
|                                       |                                                                         | RQ median           | 0,992           | 1.016                                                                        |
|                                       |                                                                         | Range               | 0.202 - 4.84    | 0.146 - 2.72                                                                 |
|                                       |                                                                         | p value             | 0.18            | 0.797                                                                        |
|                                       |                                                                         |                     |                 | 0.633                                                                        |
| <hr/>                                 |                                                                         |                     |                 |                                                                              |
|                                       |                                                                         | <b>miR-196a</b>     |                 |                                                                              |
|                                       |                                                                         | N                   | 9               | 29                                                                           |
|                                       |                                                                         | RQ median           | 4.784           | 16.99                                                                        |
|                                       |                                                                         | Range               | 0.683 - 65.11   | 1.459 - 123.9                                                                |
|                                       |                                                                         | p value             | 0.016*          | <0.001*                                                                      |
|                                       |                                                                         |                     |                 | 0.175                                                                        |
| <hr/>                                 |                                                                         |                     |                 |                                                                              |
|                                       |                                                                         | <b>miR- 222</b>     |                 |                                                                              |
|                                       |                                                                         | N                   | 9               | 30                                                                           |
|                                       |                                                                         | RQ median           | 0.734           | 0.687                                                                        |
|                                       |                                                                         | Range               | 0.409 - 1.158   | 0.112 - 1.488                                                                |
|                                       |                                                                         | p value             | 0.078           | 0.01*                                                                        |
|                                       |                                                                         |                     |                 | 0.855                                                                        |
| <hr/>                                 |                                                                         |                     |                 |                                                                              |
| L1C1:L28C3" \a \f 4 \h \* MERGEFORMAT |                                                                         |                     |                 |                                                                              |

L1C1:L28C3" \a \f 4 \h \\* MERGEFORMAT

**Additional file 2:** Expression of AnxA1 protein in adjacent normal, metaplastic and gastric tumor areas.

|                                  | <b>Normal Area<br/>(NA)<br/>N (19)</b> | <b>Metaplastic Area<br/>(MA)<br/>N (7)</b> | <b>Tumor Area<br/>(TA)<br/>N (26)</b> | <b>NA x TA</b> | <b>p Value<br/>NA x MA</b> | <b>MA x TA</b> |
|----------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| <b>Epithelium<br/>Mean ± SEM</b> | 132.5 ± 5,053                          | 158.7 ± 7,239                              | 174.6 ± 4,224                         | p < 0.001      | NS                         | NS             |
| <b>Stroma<br/>Mean ± SEM</b>     | 135.4 ± 7,651                          | 165.2 ± 4,594                              | 172.8 ± 3,268                         | p < 0.001      | NS                         | NS             |
| <b>Total Area<br/>Mean ± SEM</b> | 134,0 ± 4,529                          | 162,0 ± 4,216                              | 173,7 ± 2,638                         | p < 0.001      | NS                         | NS             |

p - value: ANOVA Test; NS: not significant

**Additional file 3:** Expression of FPR1 protein in adjacent normal, metaplastic and gastric tumor area.

p - value: ANOVA Test; NS: not significant

|                   | <b>Normal Area<br/>(NA)<br/>N (19)</b> | <b>Metaplastic Area<br/>(MA)<br/>N (7)</b> | <b>Tumor Area<br/>(TA)<br/>N (26)</b> | <b>NA x TA</b> | <b>p Value<br/>NA x MA</b> | <b>MA x TA</b> |
|-------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| <b>Epithelium</b> |                                        |                                            |                                       |                |                            |                |
| <b>Mean ± SEM</b> | 125.6 ± 6,695                          | 152.8 ± 9.32                               | 173.5 ± 5.21                          | p < 0.001      | NS                         | NS             |
| <b>Stroma</b>     |                                        |                                            |                                       |                |                            |                |
| <b>Mean ± SEM</b> | 140.4 ± 6.91                           | 157.4 ± 6.82                               | 172.3 ± 3.81                          | p < 0.01       | NS                         | NS             |
| <b>Total Area</b> |                                        |                                            |                                       |                |                            |                |
| <b>Mean ± SEM</b> | 133,0 ± 4,893                          | 155,1 ± 5,564                              | 172,9 ± 3,158                         | p < 0.001      | NS                         | NS             |

## References

1. 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.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2015, **136**(5):E359-386.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2010, **127**(12):2893-2917.
3. IARC/WHO: **Cancer Incidence in Five Continents.** In., vol. 160: Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P; 2007.
4. INCA: **Estimativa 2016/2017: Incidência de câncer no Brasil.** In. Rio de Janeiro: INCA, 2015; 2015.
5. 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 pathologica et microbiologica Scandinavica* 1965, **64**:31-49.
6. Correa P: **Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention.** *Cancer research* 1992, **52**(24):6735-6740.
7. Polk DB, Peek RM, Jr.: **Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond.** *Nature reviews Cancer* 2010, **10**(6):403-414.
8. Ding SZ, Goldberg JB, Hatakeyama M: **Helicobacter pylori infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis.** *Future oncology* 2010, **6**(5):851-862.
9. McArdle PA, Mir K, Almushatat AS, Wallace AM, Underwood MA, McMillan DC: **Systemic inflammatory response, prostate-specific antigen and survival in patients with metastatic prostate cancer.** *Urologia internationalis* 2006, **77**(2):127-129.
10. Korkaya H, Wicha MS: **Inflammation and autophagy conspire to promote tumor growth.** *Cell cycle* 2011, **10**(16):2623-2624.
11. Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, Sousa LP: **Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance.** *Journal of immunology research* 2016, **2016**:8239258.
12. Flower RJ, Rothwell NJ: **Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance.** *Trends in pharmacological sciences* 1994, **15**(3):71-76.
13. Fernandes AM, Babeto E, Rahal P, Provazzi PJ, Hidalgo CA, Anselmo-Lima WT: **Expression of genes that encode the annexin-1 and galectin-1 proteins in nasal polyposis and their modulation by glucocorticoid.** *Brazilian journal of otorhinolaryngology* 2010, **76**(2):213-218.
14. Huo XF, Zhang JW: **Annexin1 regulates the erythroid differentiation through ERK signaling pathway.** *Biochemical and biophysical research communications* 2005, **331**(4):1346-1352.
15. Alves VA, Nonogaki S, Cury PM, Wunsch-Filho V, de Carvalho MB, Michaluart-Junior P, Moyses RA, Curioni OA, Figueiredo DL, Scapulatempo-Neto C *et al*: **Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma.** *Histopathology* 2008, **53**(6):715-727.
16. John CD, Gavins FN, Buss NA, Cover PO, Buckingham JC: **Annexin A1 and the formyl peptide receptor family: neuroendocrine and metabolic aspects.** *Current opinion in pharmacology* 2008, **8**(6):765-776.
17. Khau T, Langenbach SY, Schuliga M, Harris T, Johnstone CN, Anderson RL, Stewart



- AG: **Annexin-1 signals mitogen-stimulated breast tumor cell proliferation by activation of the formyl peptide receptors (FPRs) 1 and 2.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2011, **25**(2):483-496.
18. Wang KL, Wu TT, Resetkova E, Wang H, Correa AM, Hofstetter WL, Swisher SG, Ajani JA, Rashid A, Hamilton SR *et al*: **Expression of annexin A1 in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006, **12**(15):4598-4604.
  19. Jorge YC, Mataruco MM, Araujo LP, Rossi AF, de Oliveira JG, Valsechi MC, Caetano A, Miyazaki K, Fazzio CS, Thome JA *et al*: **Expression of annexin-A1 and galectin-1 anti-inflammatory proteins and mRNA in chronic gastritis and gastric cancer.** *Mediators of inflammation* 2013, **2013**:152860.
  20. Rossi AF, Duarte MC, Poltronieri AB, Valsechi MC, Jorge YC, de-Santi Neto D, Rahal P, Oliani SM, Silva AE: **Deregulation of annexin-A1 and galectin-1 expression in precancerous gastric lesions: intestinal metaplasia and gastric ulcer.** *Mediators of inflammation* 2014, **2014**:478138.
  21. Cheng TY, Wu MS, Lin JT, Lin MT, Shun CT, Huang HY, Hua KT, Kuo ML: **Annexin A1 is associated with gastric cancer survival and promotes gastric cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1-binding protein 1 pathway.** *Cancer* 2012, **118**(23):5757-5767.
  22. Prevete N, Liotti F, Visciano C, Marone G, Melillo RM, de Paulis A: **The formyl peptide receptor 1 exerts a tumor suppressor function in human gastric cancer by inhibiting angiogenesis.** *Oncogene* 2015, **34**(29):3826-3838.
  23. Gastardelo TS, Cunha BR, Raposo LS, Maniglia JV, Cury PM, Lisoni FC, Tajara EH, Oliani SM: **Inflammation and cancer: role of annexin A1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma.** *PloS one* 2014, **9**(12):e111317.
  24. Saito N, Qiao H, Yanagi T, Shinkuma S, Nishimura K, Suto A, Fujita Y, Suzuki S, Nomura T, Nakamura H *et al*: **An annexin A1-FPR1 interaction contributes to necroptosis of keratinocytes in severe cutaneous adverse drug reactions.** *Science translational medicine* 2014, **6**(245):245ra295.
  25. Paula R, Jr., Oliani AH, Vaz-Oliani DC, D'Avila SC, Oliani SM, Gil CD: **The intricate role of mast cell proteases and the annexin A1-FPR1 system in abdominal wall endometriosis.** *Journal of molecular histology* 2015, **46**(1):33-43.
  26. de Paulis A, Prevete N, Rossi FW, Rivellesse F, Salerno F, Delfino G, Luccardo B, Avilla E, Montuori N, Mascolo M *et al*: **Helicobacter pylori Hp(2-20) promotes migration and proliferation of gastric epithelial cells by interacting with formyl peptide receptors in vitro and accelerates gastric mucosal healing in vivo.** *Journal of immunology* 2009, **183**(6):3761-3769.
  27. Cheng TY, Wu MS, Lin JT, Lin MT, Shun CT, Hua KT, Kuo ML: **Formyl Peptide receptor 1 expression is associated with tumor progression and survival in gastric cancer.** *Anticancer research* 2014, **34**(5):2223-2229.
  28. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.
  29. Thiel A, Ristimaki A: **Gastric cancer: basic aspects.** *Helicobacter* 2012, **17** Suppl 1:26-29.
  30. Nishizawa T, Suzuki H: **The role of microRNA in gastric malignancy.** *International journal of molecular sciences* 2013, **14**(5):9487-9496.

31. Zheng G, Xiong Y, Xu W, Wang Y, Chen F, Wang Z, Yan Z: **A two-microRNA signature as a potential biomarker for early gastric cancer.** *Oncology letters* 2014, **7**(3):679-684.
32. Cadamuroac, Rossi AF, Maniezzo NM, Silva AE: **Helicobacter pylori infection: host immune response, implications on gene expression and microRNAs.** *World journal of gastroenterology* 2014, **20**(6):1424-1437.
33. Ishimoto T, Baba H, Izumi D, Sugihara H, Kurashige J, Iwatsuki M, Tan P: **Current perspectives towards the identification of key players in gastric cancer microRNA dysregulation.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2016.
34. Fu Z, Qian F, Yang X, Jiang H, Chen Y, LIU S: **Circulating miR-222 in plasma and its potential diagnostic and prognostic value in gastric cancer.** *Medical oncology* 2014, **31**(9):164.
35. Song B, Yan G, Hao H, Yang B: **rs11671784 G/A and rs895819 A/G polymorphisms inversely affect gastric cancer susceptibility and miR-27a expression in a Chinese population.** *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2014, **20**:2318-2326.
36. Liu L, Wang S, Cao X, Liu J: **Diagnostic value of circulating microRNAs for gastric cancer in Asian populations: a meta-analysis.** *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2014, **35**(12):11995-12004.
37. Wang M, Zhao C, Shi H, Zhang B, Zhang L, Zhang X, Wang S, Wu X, Yang T, huang F *et al*: **Deregulated microRNAs in gastric cancer tissue-derived mesenchymal stem cells: novel biomarkers and a mechanism for gastric cancer.** *British journal of cancer* 2014, **110**(5):1199-1210.
38. Zhao X, Yang L, Hu J: **Down-regulation of miR-27a might inhibit proliferation and drug resistance of gastric cancer cells.** *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2011, **30**:55.
39. Huang D, Wang H, LIU R, Li H, Ge S, Bai M, Deng T, Yao G, Ba Y: **miRNA27a is a biomarker for predicting chemosensitivity and prognosis in metastatic or recurrent gastric cancer.** *Journal of cellular biochemistry* 2014, **115**(3):549-556.
40. Liao YL, Hu LY, TSAI KW, Wu CW, Chan WC, Li SC, Lai CH, Ho MR, Fang WL, huang KH *et al*: **Transcriptional regulation of miR-196b by ETS2 in gastric cancer cells.** *Carcinogenesis* 2012, **33**(4):760-769.
41. Zhou H, Wang K, Hu Z, Wen J: **TGF-beta1 alters microRNA profile in human gastric cancer cells.** *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu* 2013, **25**(1):102-111.
42. Tsai MM, Wang CS, tsai CY, Chen CY, Chi HC, Tseng YH, Chung PJ, Lin YH, Chung IH, Chen CY *et al*: **MicroRNA-196a/-196b promote cell metastasis via negative regulation of radixin in human gastric cancer.** *Cancer letters* 2014, **351**(2):222-231.
43. Wang H, Wang L, Wu Z, Sun R, Jin H, Ma J, LIU L, Ling R, Yi J, Wang L *et al*: **Three dysregulated microRNAs in serum as novel biomarkers for gastric cancer screening.** *Medical oncology* 2014, **31**(12):298.
44. Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, Barkoh BA, Chen SS, Ensor J, Maru DM *et al*: **MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers.** *Oncogene* 2008, **27**(52):6667-6678.
45. Pin AL, Houle F, Fournier P, Guillonneau M, Paquet ER, Simard MJ, Royal I, Huot J: **Annexin-1-mediated endothelial cell migration and angiogenesis are regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced inhibition of miR-196a expression.** *The Journal of biological chemistry* 2012, **287**(36):30541-30551.

46. miRBase: **miRBase: the microRNA database**. In.; Release 21. June 2014.
47. Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, Anastasopoulos IL, Maniou S, Karathanou K, Kalfakakou D *et al*: **DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions**. *Nucleic acids research* 2015, **43**(Database issue):D153-159.
48. Cadamuroac, Rossi AF, Matos Biselli-Perico J, Fucuta Pereira P, Do Vale EP, Acayaba R, Leite KR, Goloni-Bertollo EM, Silva AE: **Effect of Helicobacter pylori eradication on TLR2 and TLR4 expression in patients with gastric lesions**. *Mediators of inflammation* 2015, **2015**:481972.
49. Rossi AF, Cadamuroac, Biselli-Perico JM, Leite KR, Severino FE, Reis PP, Cordeiro JA, Silva AE: **Interaction between inflammatory mediators and miRNAs in Helicobacter pylori infection**. *Cellular microbiology* 2016.
50. 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**(4):402-408.
51. Tukey JW: **Exploratory Data Analysis (Limited Preliminary Edition)**: Addison-wesley, Reading, MA. [1.2, 2.7]; 1970.
52. Guo C, LIU S, Sun MZ: **Potential role of Anxa1 in cancer**. *Future oncology* 2013, **9**(11):1773-1793.
53. Zhu F, Xu C, Jiang Z, Jin M, Wang L, Zeng S, Teng L, Cao J: **Nuclear localization of annexin A1 correlates with advanced disease and peritoneal dissemination in patients with gastric carcinoma**. *Anatomical record* 2010, **293**(8):1310-1314.
54. Zhang ZQ, Li XJ, LIU GT, Xia Y, Zhang XY, Wen H: **Identification of Annexin A1 protein expression in human gastric adenocarcinoma using proteomics and tissue microarray**. *World journal of gastroenterology* 2013, **19**(43):7795-7803.
55. Gao Y, Chen Y, Xu D, Wang J, Yu G: **Differential expression of ANXA1 in benign human gastrointestinal tissues and cancers**. *BMC cancer* 2014, **14**:520.
56. Boudhraa Z, Merle C, Mazzocut D, Chezal JM, Chambon C, Miot-Noirault E, Theisen M, Bouchon B, Degoul F: **Characterization of pro-invasive mechanisms and N-terminal cleavage of ANXA1 in melanoma**. *Archives of dermatological research* 2014, **306**(10):903-914.
57. D'Acunto CW, Gbelcova H, Festa M, Ruml T: **The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation**. *Cellular signalling* 2014, **26**(1):173-178.
58. de Graauw M, van Miltenburg MH, Schmidt MK, Pont C, Lalai R, Kartopawiro J, Pardali E, Le Devedec SE, Smit VT, van der Wal A *et al*: **Annexin A1 regulates TGF-beta signaling and promotes metastasis formation of basal-like breast cancer cells**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(14):6340-6345.
59. Cooray SN, Gobetti T, Montero-Melendez T, McArthur S, Thompson D, Clark AJ, Flower RJ, Perretti M: **Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **110**(45):18232-18237.
60. Kao W, Gu R, Jia Y, Wei X, Fan H, Harris J, Zhang Z, Quinn J, Morand EF, Yang YH: **A formyl peptide receptor agonist suppresses inflammation and bone damage in arthritis**. *British journal of pharmacology* 2014, **171**(17):4087-4096.
61. Belvedere R, Bizzarro V, Popolo A, Dal Piaz F, Vasaturo M, Picardi P, Parente L, Petrella A: **Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells**. *BMC cancer* 2014, **14**:961.

62. Irmak-Yazicioglu MB: **Mechanisms of MicroRNA Deregulation and MicroRNA Targets in Gastric Cancer.** *Oncology research and treatment* 2016, **39**(3):136-139.
63. Tang W, Zhu J, Su S, Wu W, Liu Q, Su F, Yu F: **MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival.** *PloS one* 2012, **7**(12):e51702.
64. Taheriazam A, Bahador R, Karbasy SH, Jamshidi SM, Torkaman A, Yahaghi E, Shakeri M: **Down-regulation of microRNA-26a and up-regulation of microRNA-27a contributes to aggressive progression of human osteosarcoma.** *Diagnostic pathology* 2015, **10**:166.
65. Miao Y, Li J, Qiu X, Li Y, Wang Z, Luan Y: **miR-27a regulates the self renewal of the H446 small cell lung cancer cell line in vitro.** *Oncology reports* 2013, **29**(1):161-168.
66. Park JL, Kim M, Song KS, Kim SY, Kim YS: **Cell-Free miR-27a, a Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker for Gastric Cancer.** *Genomics & informatics* 2015, **13**(3):70-75.
67. Matsuzaki J, Suzuki H: **Role of MicroRNAs-221/222 in Digestive Systems.** *Journal of clinical medicine* 2015, **4**(8):1566-1577.
68. LIU W, Song N, Yao H, ZHAO L, LIU H, Li G: **miR-221 and miR-222 Simultaneously Target RECK and Regulate Growth and Invasion of Gastric Cancer Cells.** *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2015, **21**:2718-2725.
69. Li N, Tang B, Zhu ED, Li BS, Zhuang Y, Yu S, Lu DS, Zou QM, Xiao B, Mao XH: **Increased miR-222 in H. pylori-associated gastric cancer correlated with tumor progression by promoting cancer cell proliferation and targeting RECK.** *FEBS letters* 2012, **586**(6):722-728.
70. CHUN-ZHI Z, Lei H, An-Ling Z, Yan-Chao F, Xiao Y, Guang-Xiu W, Zhi-Fan J, Pei-Yu P, Qing-Yu Z, Chun-Sheng K: **MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN.** *BMC cancer* 2010, **10**:367.
71. Li N, Yu N, Wang J, Xi H, Lu W, Xu H, Deng M, ZHENG G, LIU H: **miR-222/VGLL4/YAP-TEAD1 regulatory loop promotes proliferation and invasion of gastric cancer cells.** *American journal of cancer research* 2015, **5**(3):1158-1168.
72. Schimanski CC, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, Galle PR, Moehler M, Gockel I: **High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells.** *World journal of gastroenterology* 2009, **15**(17):2089-2096.
73. 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.** *Molecular medicine reports* 2009, **2**(6):963-970.
74. Sun M, Liu XH, Li JH, Yang JS, Zhang EB, Yin DD, LIU ZL, Zhou J, Ding Y, Li SQ *et al*: **MiR-196a is upregulated in gastric cancer and promotes cell proliferation by downregulating p27(kip1).** *Molecular cancer therapeutics* 2012, **11**(4):842-852.
75. Lee SJ, Seo JW, Chae YS, Kim JG, Kang BW, Kim WW, Jung JH, Park HY, Jeong JY, Park JY: **Genetic polymorphism of miR-196a as a prognostic biomarker for early breast cancer.** *Anticancer research* 2014, **34**(6):2943-2949.
76. Jin K, Sukumar S: **A pivotal role for HOXB7 protein in endocrine resistant breast cancer.** *Oncoscience* 2015, **2**(11):917-919.
77. Chen X, Liu J, He B, Li Y, LIU S, Wu B, Wang S, Zhang S, Xu X, Wang J: **Vascular endothelial growth factor (VEGF) regulation by hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF1A) starts and peaks during endometrial breakdown, not repair, in a mouse menstrual-like model.** *Human reproduction* 2015, **30**(9):2160-2170.
78. Alonso CR: **Hox proteins: sculpting body parts by activating localized cell death.**

- Current biology : CB* 2002, **12**(22):R776-778.
79. Hao Y, Wang J, Zhao L: **The effect and mechanism of miR196a in HepG2 cell.** *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2015, **72**:1-5.
  80. Fan Y, Fan J, Huang L, Ye M, Huang Z, Wang Y, Li Q, Huang J: **Increased expression of microRNA-196a predicts poor prognosis in human ovarian carcinoma.** *International journal of clinical and experimental pathology* 2015, **8**(4):4132-4137.
  81. Guan Y, Chen L, Bao Y, Qiu B, Pang C, Cui R, Wang Y: **High miR-196a and low miR-367 cooperatively correlate with unfavorable prognosis of high-grade glioma.** *International journal of clinical and experimental pathology* 2015, **8**(6):6576-6588.
  82. Li JH, Luo N, Zhong MZ, Xiao ZQ, Wang JX, Yao XY, Peng Y, Cao J: **Inhibition of microRNA-196a might reverse cisplatin resistance of A549/DDP non-small-cell lung cancer cell line.** *Tumour biology : the journal of the International Society for Onco developmental Biology and Medicine* 2016, **37**(2):2387-2394.
  83. Suh YE, Raulf N, Gaken J, Lawler K, Urbano TG, Bullenkamp J, Gobeil S, Huot J, Odell E, Tavassoli M: **MicroRNA-196a promotes an oncogenic effect in head and neck cancer cells by suppressing annexin A1 and enhancing radioresistance.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2015, **137**(5):1021-1034.
  84. Anbalagan D, Yap G, Yuan Y, PANDEY VK, Lau WH, Arora S, Bist P, Wong JS, Sethi G, Nissom PM *et al*: **Annexin-A1 regulates microRNA-26b\* and microRNA-562 to directly target NF-kappaB and angiogenesis in breast cancer cells.** *PloS one* 2014, **9**(12):e114507.
  85. Zhang Z, Huang L, Zhao W, Rigas B: **Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF-kappaB and inhibits its activation: anticancer effects in vitro and in vivo.** *Cancer research* 2010, **70**(6):2379-2388.
  86. Stenholm L, Stoehlmacher-Williams J, Al-Batran SE, Heussen N, Akin S, Pauligk C, Lehmann S, Senff T, Hofheinz RD, Ehninger G *et al*: **Prognostic role of microRNA polymorphisms in advanced gastric cancer: a translational study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO).** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013, **24**(10):2581-2588.



## *Discussão*

#### IV. Discussão

A associação entre inflamação e câncer tem sido estudada para diferentes neoplasias, como o câncer gástrico (RASCH; ALGUL, 2014; ECHIZEN et al., 2016; MERGA et al., 2016), e um alvo interessante para investigações nesta área é a proteína anti-inflamatória Anexina A1 (AnxA1), já que influencia diretamente a migração, diferenciação e morte celular (LIM; PERVAIZ, 2007; GAO et al., 2014).

De acordo com nossos achados foi possível constatar aumento da expressão do RNAm da *ANXA1* e miR-196, nos tumores em relação ao tecido normal. A *ANXA1* parece ser alvo do miR-196a também para o câncer gástrico, já que encontramos uma correlação inversa entre eles. Quanto a avaliação proteica, observamos que o FPR2 não é expresso no tecido gástrico, seja normal, metaplásico ou tumoral, porém a AnxA1 e FPR1 apresentaram marcação positiva e amplamente distribuída nos tumores.

No presente estudo foi possível constatar que a proteína AnxA1 se apresentou altamente expressa nos tecidos tumorais e áreas metaplásicas adjacentes quando comparada à expressão no tecido gástrico normal. Esta proteína é pesquisada em diferentes patologias, como por exemplo, no infarto agudo do miocárdio (QIN et al., 2015), diabetes (PIETRANI et al., 2014), uveíte (GIROL et al., 2013), glomerulonefrite (Ka et al., 2014) e tumores (GUO et al., 2013), dentre outras doenças relacionadas à inflamação, demonstrando que a atuação da AnxA1 é tecido - específica e participa ativamente de diferentes processos celulares (FATIMATHAS; MOSS, 2010).

Para o câncer gástrico a maioria dos estudos relatam aumento da expressão (ZHU et al., 2010; SATO et al., 2011) como observado no presente trabalho, porém outros autores encontraram resultados distintos aos nossos, ou seja, a diminuição da AnxA1 nos tumores gástricos em relação ao tecido gástrico normal (HIPPO et al., 2001; YU et al., 2008), sugerindo que a ação que a proteína exerce sobre determinado tipo tumoral depende da sua



localização celular, sendo a localização nuclear ligada à transformação celular e câncer, ocasionada por estímulos gerados após o dano celular, e a localização no citoplasma ou membrana plasmática permitindo que a AnxA1 seja clivada ou se torne acessível aos receptores FPRs, os estimulando a disparar vias oncogênicas em diversos tipos de câncer (BOUDHRAA et al., 2014). A ação desta proteína também depende de qual resíduo proteico está fosforilado, já que a atividade da proteína parece diferir de acordo com a fosforilação e sua consequente modificação conformacional, influenciando diretamente na função da proteína que pode atuar tanto na inibição quanto na indução da inflamação (D'ACUNTO et al., 2014).

Apesar dos resultados contraditórios da expressão da AnxA1 em câncer gástrico, acredita-se que a ação desta proteína possa ocorrer por diferentes vias, como a ativação da COX-2 quando há inibição da AnxA1 (GAO et al., 2014), por meio da ativação da quinase-integrina 1 beta após a fosforilação da via ERK, envolvida com desenvolvimento e progressão em cânceres, causada pelo aumento da expressão da AnxA1 (CHENG et al., 2012), bem como pela manutenção do metabolismo e proliferação celular pela ativação da AnxA1 em substituição do fator de transcrição HIF1A (*hypoxia inducible factor 1 alpha subunit*), relacionado com a adaptação das células cancerosas à hipóxia (ROHWER et al., 2016).

Para que a AnxA1 desempenhe suas funções, assim como atue no processo carcinogênico e outras patologias é necessário a sua ligação com alguns receptores. Sabe-se que sua forma extracelular interage com receptores formil peptídeos (FPRs), exercendo papel importante na invasão e metástase (DE GRAAUW et al., 2011).

São encontrados três tipos de receptores FPRs em humanos, FPR1, FPR2 e FPR3, os quais são receptores transmembrânicos ligados à proteína G, que estão envolvidos na modulação da resposta imune inata, inflamação e câncer (PREVETE et al., 2015). Estes receptores se ligam à AnxA1 podendo se apresentar nas formas de homo ou heterodímero, o

que interfere diretamente sobre sua ação biológica, na indução ou inibição da inflamação, bem como na transdução de sinais pró-apoptóticos (COORAY et al., 2013). A ligação destes receptores com a AnxA1 foi relatada em diferentes modelos experimentais e doenças, como AnxA1/FPR2 em câncer de células escamosas de laringe (GASTARDELO et al., 2014), AnxA1/FPR1/FPR2 em células de carcinoma pancreático (BELVEDERE et al., 2014) e AnxA1/FPR2 em artrite (KAO et al., 2014).

Especificamente para o câncer gástrico esta relação é mediada principalmente por meio do FPR1, de acordo com dados recentes da literatura (CHENG et al., 2014; PREVETE et al., 2015). Contudo, CHENG et al. (2012) observaram que após o silenciamento individualmente dos receptores FPR1, FPR2 e FPR3 em linhagem de câncer gástrico havia diminuição do poder de invasão destas células, indicando que este processo era mediado pela AnxA1 envolvendo os três tipos de receptores FPRs (CHENG et al., 2012).

No presente estudo encontramos aumento da expressão do receptor FPR1 correlacionado com a expressão da AnxA1, tanto em áreas metaplásicas adjacentes ao tumor quanto no tecido tumoral em relação à mucosa gástrica normal. Contudo, não foi observada imunomarcagem positiva para o receptor FPR2, inclusive no tecido normal. Similarmente, Cheng et al. (2014) também relataram correlação positiva da expressão da AnxA1 e FPR1 em tumores gástricos, os quais foram associados com estadiamento IV, invasão da submucosa e serosa e resultado clínico, assim como nas linhagens gástricas AGS e N87. Portanto, sugerindo uma regulação de *feedback* positivo na via de transdução de sinal AnxA1-FPR1.

Apesar de nossos resultados mostrarem correlação positiva da AnxA1-FPR1 com expressão crescente a partir do tecido gástrico normal, com marcação fraca, aumento da expressão nas áreas metaplásicas e forte marcação nos tumores, principalmente nos casos mais avançados, não foi possível estabelecer associação com parâmetros clinico-patológicos como metástase, tamanho do tumor e estadiamento TNM, provavelmente devido ao número

amostral reduzido. Contudo, em outros estudos tanto a AnxA1 como o FPR1 têm sido indicados como potentes marcadores de prognóstico do câncer gástrico (CHENG et al., 2012; ZHANG et al., 2013; CHENG et al., 2014).

Adicionalmente, avaliamos a expressão do RNAm da AnxA1 e de alguns miRNAs que possam estar desregulados e modularem a expressão dessa proteína no câncer gástrico (LUTHRA et al., 2008; PIN et al., 2012; ANBALAGAN et al., 2014; SUH et al., 2015).

Nossos resultados mostraram expressão relativa aumentada do RNAm da *ANXA1* e do miR-196a nas amostras de câncer gástrico, assim como uma correlação inversa entre eles. O miR-222 se apresentou mais expresso nos tecidos gástricos normais que nos tumores. Contudo, não foi observada alteração significativa na expressão do miR-27a nas amostras avaliadas.

Expressão gênica elevada da *ANXA1* em câncer gástrico tem sido relatada por outros autores (CHENG et al., 2012; ZHENG et al., 2013; GAO et al., 2014), inclusive pelo nosso grupo de pesquisa, que também observou expressão gênica e proteica aumentada da Anexina-A1 em lesões pré-cancerosas como gastrite crônica, metaplasia intestinal e úlcera gástrica independente da infecção pela *H. pylori* (JORGE et al., 2012; ROSSI et al., 2014). Entretanto, este é o primeiro estudo que mostrou correlação entre a *ANXA1* e miR-196a, sugerindo uma nova via de regulação desta proteína no câncer gástrico.

O miR-27a não se apresentou diferencialmente expresso no tumor em relação ao tecido normal, diferentemente de outros estudos que comprovaram este miRNA atuando como oncogene em câncer gástrico (ZHANG et al., 2011) e como biomarcador plasmático para esta doença (ISHIMOTO et al., 2016). Possivelmente devido ao número amostral avaliado este miRNA não tenha sido associado ao câncer gástrico neste estudo.

O miR-222, se apresentou mais expresso em tecido gástrico normal que no tumoral, resultado controverso em relação a achados na literatura que indicam a ação do mesmo no

crescimento e invasão nas células de câncer gástrico (CHUN-ZHI et al., 2010; LI et al., 2015). Porém, é válido ressaltar que os estudos normalmente associam a expressão deste miRNA ao miR-221, já que juntos tem como alvo um *cluster* gênico e atuam sinergicamente como oncogenes, e sua ativação está relacionada à presença da bactéria *H. pylori* (KIM et al., 2009; LIU et al., 2015; MATSUZAKI; SUZUKI, 2015). Neste trabalho o miR-222 foi avaliado individualmente, e a maioria dos pacientes não eram infectados pelo *H. pylori*, talvez por esta razão não tenha se encontrado a associação do mesmo com a doença. Entretanto sua ação deve ser melhor investigada para este câncer baseando-se nestas contradições. A avaliação de alvos preditos para este miRNA também pode ser útil quanto a definição do papel deste miRNA no câncer gástrico.

Interessantemente o miR-196a apresentou-se hiperexpresso nas amostras de câncer gástrico e também nas áreas metaplásicas adjacentes ao tumor e inversamente correlacionado com a expressão do RNAm da *ANXA1*. Apesar desta correlação não ter sido validada por estudos funcionais, estes achados são sugestivos que *ANXA1* é regulada pós-transcricionalmente pelo miR-196a. Esta hipótese é fundamentada em outros estudos que evidenciaram o RNAm da *ANXA1* como alvo validado do miR-196a em diferentes linhagens como câncer de cabeça e pescoço (SUH et al., 2015), câncer de esôfago, mama e endométrio (LUTHRA et al., 2008). O miR-196a se liga a região 3'UTR da *ANXA1* inibindo-a transcricionalmente, assim resultando na ação do miR-196a com aumento da proliferação celular, no crescimento independente de ancoragem e supressão da apoptose (LUTHRA et al., 2008).

Recentemente foi demonstrado que a inibição da *ANXA1* pelo miR-196a consequentemente atua na angiogênese tumoral, levando a inibição da migração das células endoteliais e angiogênese induzida por VEGF (*vascular endothelial growth factor*). PIN et al. (2012) verificaram que células endoteliais derivadas de cordão umbilical humano

(HUVECs) transfectadas com miR-196a mimético apresentavam redução da expressão de *ANXA1* em 40%, enquanto, a inibição deste miRNA com um antagomir reduzia os níveis da *ANXA1*. Os autores também verificaram que a expressão da *ANXA1* era aumentada através de VEGF, que promovia a redução do nível de expressão do miR-196a, conseqüentemente favorecendo a expressão da *ANXA1*, e assim permitindo a migração celular e angiogênese. Este mecanismo demonstra a complexa relação entre os miRNAs e a inibição da transcrição gênica, que pode envolver diferentes vias de sinalização celular e tipos celulares, dessa forma influenciando diretamente no processo carcinogênico.

Os resultados do presente estudo, não permitem afirmar que esta via gênica também se encontre desregulada no câncer gástrico, porém os achados abrem novas perspectivas para investigações futuras quanto a relação entre miR-196a:AnxA1 e receptor FPR1 no desenvolvimento e progressão desta neoplasia, assim como a regulação do processo de angiogênese importante para a formação de metástases. Desta forma, podendo indicar novos alvos moleculares para o desenvolvimento de drogas que atuem nestes processos.

Vários estudos têm destacado o miR-196a como desregulado em diferentes tipos de câncer relacionados com comportamento mais agressivo e metastático (SUH et al., 2015, YUAN et al., 2016). Em câncer gástrico tem sido indicado como biomarcador associado com metástase em linfonodo, estágio clínico (LI et al., 2015), progressão tumoral, diminuição da sobrevida, aumento da capacidade de migração e invasão das células cancerosas, sendo estudado quanto ao potencial terapêutico para suprimir a metástase gástrica (TSAI et al., 2014).

Considerando o valor prognóstico dos miRNAs associados com parâmetros clínico-patológicos, o presente estudo não evidenciou nenhuma relação, exceto para o miR-196a que apresentou aumento de expressão associado ao sexo feminino, fato não descrito em outros estudos. Contudo, pode estar relacionado com diferenças hormonais que ocorre entre os

sexos. Por exemplo, o estrógeno talvez possa interferir neste processo já que polimorfismos neste miRNA são considerados possíveis biomarcadores de diagnóstico para pacientes com câncer de mama precoce que expressam receptores de hormônio (LEE et al., 2014), e o miR-196a tem como alvo o gene *HOXB7* que interage fisicamente com o receptor de estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ) levando a resistência endócrina em câncer de mama (JIN et al., 2015). É válido ressaltar que o VEGF é também um alvo validado do miR-196a, e este fator de crescimento endotelial é essencial para o reparo endometrial, portanto seus níveis variam constantemente de acordo com a fase do ciclo menstrual (CHEN et al., 2015).

A correlação inversa entre *ANXA1* e miR-196a e consequente ação sobre a angiogênese tumoral foi comprovada em experimento realizado com células endoteliais derivadas de cordão umbilical humano (HUVECs). Tal fato se daria por meio da inibição da *ANXA1* e consequente aumento do miR-196a, que pode ser modulado a qualquer momento pelas células cancerosas, habilitando então o VEGF como um “interruptor” deste processo, o qual seria acionado com a diminuição da expressão do miR-196a para que os níveis de *ANXA1* se mantivessem altos o suficiente para que as células endoteliais pudessem migrar e a angiogênese ocorrer em resposta ao VEGF (PIN et al., 2012). Este mecanismo demonstra a complexa relação entre os miRNAs e a inibição da transcrição gênica, que não se restringe apenas a relação de um único gene alvo validado para determinado miRNA, e que pode diferir entre os distintos momentos do ciclo celular, o que influencia diretamente o processo de carcinogênese.

É precoce dizer que esta mesma via gênica atue também no câncer gástrico, porém com os achados destes trabalhos destaca-se a necessidade de maiores investigações em relação a influência da *AnxA1*, *FPR1* e miR-196a no desenvolvimento deste tipo de câncer e em particular sobre a formação de novos vasos em tumores gástricos.



## *Conclusões*



## V. Conclusões

No presente estudo, comparando-se regiões de adenocarcinoma gástrico às suas respectivas áreas adjacentes metaplásicas ou normais, é possível concluir que:

1. A proteína Anexina A1 e o receptor FPR1 se apresentam amplamente expressos e positivamente correlacionados no câncer gástrico. Contudo, os tecidos avaliados não apresentam imunorreatividade para o receptor FPR2, assim destacando a via de sinalização AnxA1/FPR1 para esta neoplasia.
2. O RNAm da *ANXA1* e do miR-196a encontram-se desregulados no câncer gástrico e apresentam-se inversamente correlacionados, sugerindo que *ANXA1* é regulada pós-transcricionalmente por este oncomir, assim desempenhando papel importante no câncer gástrico. Contudo, não há evidências de desregulação dos miR-27a e miR-222 nas amostras de câncer gástrico avaliadas.
3. Nas amostras de câncer gástrico a expressão dos miRNAs avaliados e da *ANXA1* não estão associadas com parâmetros clínico-patológicos, apenas o miR-196a está associado ao sexo feminino

## *Referências*

## Referências

- AHN, H.J.; LEE, D.S. Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis. **World J Gastrointest Oncol.** v.7, n.12, p.455-465, 2015.
- ALVES, V.A. et al. Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **Histopathology.** v.53, n.6, p.715-727, 2008.
- ANBALAGAN, D. et al. Annexin-A1 regulates microRNA-26b\* and microRNA-562 to directly target nNF-kappaB and angiogenesis in breast cancer cells. **PLoS One.** v.9, n.12, p.e114507, 2014.
- ARGENT, R.H. et al. Functional association between the Helicobacter pylori virulence factors VacA and CagA. **J Med Microbiol.** v.57, n.Pt 2, p.145-150, 2008.
- ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J. Coadaptation of Helicobacter pylori and humans: ancient history, modern implications. **J Clin Invest.** v.119, n.9, p.2475-2487, 2009.
- BARTCHEWSKY, W., JR. et al. Effect of Helicobacter pylori infection on IL-8, IL-1beta and COX-2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. **Scand J Gastroenterol.** v.44, n.2, p.153-161, 2009.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell.** v.116, n.2, p.281-297, 2004.
- BELVEDERE, R. et al. Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells. **BMC Cancer.** v.14, p.961, 2014.
- BIAOXUE, R. et al. Upregulation of Hsp90-beta and annexin A1 correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. **J Exp Clin Cancer Res.** v.31, p.70, 2012.
- BOLDERSON, E. et al. Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. **Clin Cancer Res.** v.15, n.20, p.6314-6320, 2009.
- BORNSCHEIN, J. et al. From gastric inflammation to gastric cancer. **Dig Dis.** v.28, n.4-5, p.609-614, 2010.
- BOUDHRAA, Z. et al. Characterization of pro-invasive mechanisms and N-terminal cleavage of ANXA1 in melanoma. **Arch Dermatol Res.** v.306, n.10, p.903-914, 2014.
- CADAMURO, A.C. et al. Helicobacter pylori infection: host immune response, implications on gene expression and microRNAs. **World J Gastroenterol.** v.20, n.6, p.1424-1437, 2014.
- CAO, D. et al. The Protective Effects of 18beta-Glycyrrhetic Acid on Helicobacter pylori-Infected Gastric Mucosa in Mongolian Gerbils. **Biomed Res Int.** v.2016, p.4943793, 2016.
- CHEN, X. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) regulation by hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF1A) starts and peaks during endometrial breakdown, not repair, in a mouse menstrual-like model. **Hum Reprod.** v.30, n.9, p.2160-2170, 2015.

CHENG, T.Y. et al. Formyl Peptide receptor 1 expression is associated with tumor progression and survival in gastric cancer. **Anticancer Res.** v.34, n.5, p.2223-2229, 2014.

CHENG, T.Y. et al. Annexin A1 is associated with gastric cancer survival and promotes gastric cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1-binding protein 1 pathway. **Cancer.** v.118, n.23, p.5757-5767, 2012.

CHEY, W.D.; WONG, B.C.; PRACTICE PARAMETERS COMMITTEE OF THE AMERICAN COLLEGE OF, G. American College of Gastroenterology guideline on the management of Helicobacter pylori infection. **Am J Gastroenterol.** v.102, n.8, p.1808-1825, 2007.

CHOLI-PAPADOPOULOU, T. et al. Helicobacter pylori neutrophil activating protein as target for new drugs against H. pylori inflammation. **World J Gastroenterol.** v.17, n.21, p.2585-2591, 2011.

CHUN-ZHI, Z. et al. MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN. **BMC Cancer.** v.10, p.367, 2010.

COORAY, S.N. et al. Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.110, n.45, p.18232-18237, 2013.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res.** v.52, n.24, p.6735-6740, 1992.

COVER, T.L. Helicobacter pylori Diversity and Gastric Cancer Risk. **MBio.** v.7, n.1, p.e01869-01815, 2016.

COVER, T.L. et al. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. **Cancer Res.** v.63, n.5, p.951-957, 2003.

D'ACUNTO, C.W. et al. Histone deacetylase inhibitor FR235222 sensitizes human prostate adenocarcinoma cells to apoptosis through up-regulation of Annexin A1. **Cancer Lett.** v.295, n.1, p.85-91, 2010.

D'ACUNTO, C.W. et al. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. **Cell Signal.** v.26, n.1, p.173-178, 2014.

DE FLORA, S.; LA MAESTRA, S. Epidemiology of cancers of infectious origin and prevention strategies. **J Prev Med Hyg.** v.56, n.1, p.E15-20, 2015.

DE GRAAUW, M. et al. Annexin A1 regulates TGF-beta signaling and promotes metastasis formation of basal-like breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.107, n.14, p.6340-6345, 2010.

DE PAULIS, A. et al. Helicobacter pylori Hp(2-20) promotes migration and proliferation of

gastric epithelial cells by interacting with formyl peptide receptors in vitro and accelerates gastric mucosal healing in vivo. **J Immunol.** v.183, n.6, p.3761-3769, 2009.

DELTENRE, M.; DE KOSTER, E. How come I've got it? (A review of *Helicobacter pylori* transmission). **Eur J Gastroenterol Hepatol.** v.12, n.5, p.479-482, 2000.

DING, S.Z.; GOLDBERG, J.B.; HATAKEYAMA, M. *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. **Future Oncol.** v.6, n.5, p.851-862, 2010.

DORER, M.S.; FERRO, J.; SALAMA, N.R. DNA damage triggers genetic exchange in *Helicobacter pylori*. **PLoS Pathog.** v.6, n.7, p.e1001026, 2010.

ECHIZEN, K. et al. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways. **Cancer Sci.** v.107, n.4, p.391-397, 2016.

FATIMATHAS, L.; MOSS, S.E. Annexins as disease modifiers. **Histol Histopathol.** v.25, n.4, p.527-532, 2010.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer.** v.136, n.5, p.E359-386, 2015.

FERNANDES, A.M. et al. Expression of genes that encode the annexin-1 and galectin-1 proteins in nasal polyposis and their modulation by glucocorticoid. **Braz J Otorhinolaryngol.** v.76, n.2, p.213-218, 2010.

FU, Z. et al. Circulating miR-222 in plasma and its potential diagnostic and prognostic value in gastric cancer. **Med Oncol.** v.31, n.9, p.164, 2014.

FUCCIO, L. et al. Meta-analysis: can *Helicobacter pylori* eradication treatment reduce the risk for gastric cancer? **Ann Intern Med.** v.151, n.2, p.121-128, 2009.

GAO, Y. et al. Differential expression of ANXA1 in benign human gastrointestinal tissues and cancers. **BMC Cancer.** v.14, p.520, 2014.

GASTARDELO, T.S. et al. Inflammation and cancer: role of annexin A1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma. **PLoS One.** v.9, n.12, p.e111317, 2014.

GIROL, A.P. et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **J Immunol.** v.190, n.11, p.5689-5701, 2013.

GRABSCH, H.I.; TAN, P. Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. **Dig Surg.** v.30, n.2, p.150-158, 2013.

GU, S. et al. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. **Nat Struct Mol Biol.** v.16, n.2, p.144-150, 2009.

GUO, C.; LIU, S.; SUN, M.Z. Potential role of Anxa1 in cancer. **Future Oncol.** v.9, n.11,

p.1773-1793, 2013.

HATAKEYAMA, M. Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. **Oncogene**. v.27, n.55, p.7047-7054, 2008.

HIPPO, Y. et al. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. **Cancer Res**. v.61, n.3, p.889-895, 2001.

HU, Y. et al. The Importance of Toll-like Receptors in NF-kappaB Signaling Pathway Activation by *Helicobacter pylori* Infection and the Regulators of this Response. **Helicobacter**. 2016.

HUANG, D. et al. miRNA27a is a biomarker for predicting chemosensitivity and prognosis in metastatic or recurrent gastric cancer. **J Cell Biochem**. v.115, n.3, p.549-556, 2014.

HUO, X.F.; ZHANG, J.W. Annexin1 regulates the erythroid differentiation through ERK signaling pathway. **Biochem Biophys Res Commun**. v.331, n.4, p.1346-1352, 2005.

INCA. Estimativa 2016/2017: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

ISHIMOTO, T. et al. Current perspectives towards the identification of key players in gastric cancer microRNA dysregulation. **Int J Cancer**. 2016.

ISOMOTO, H.; MOSS, J.; HIRAYAMA, T. Pleiotropic actions of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. **Tohoku J Exp Med**. v.220, n.1, p.3-14, 2010.

ISRAEL, D.A. et al. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.98, n.25, p.14625-14630, 2001.

JANG, J. et al. Malgun (clear) cell change in *Helicobacter pylori* gastritis reflects epithelial genomic damage and repair. **Am J Pathol**. v.162, n.4, p.1203-1211, 2003.

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

JIN, K.; SUKUMAR, S. A pivotal role for HOXB7 protein in endocrine resistant breast cancer. **Oncoscience**. v.2, n.11, p.917-919, 2015.

JOHN, B. et al. Human MicroRNA targets. **PLoS Biol**. v.2, n.11, p.e363, 2004.

JOHN, C.D. et al. Annexin A1 and the formyl peptide receptor family: neuroendocrine and metabolic aspects. **Curr Opin Pharmacol**. v.8, n.6, p.765-776, 2008.

JORGE, Y.C. et al. Expression of annexin-A1 and galectin-1 anti-inflammatory proteins and mRNA in chronic gastritis and gastric cancer. **Mediators Inflamm**. v.2013, p.152860, 2013.

KA, S.M. et al. Urine annexin A1 as an index for glomerular injury in patients. **Dis Markers**. v.2014, p.854163, 2014.

KAMANGAR, F.; SHEIKHATTARI, P.; MOHEBTASH, M. *Helicobacter pylori* and its

- effects on human health and disease. **Arch Iran Med.** v.14, n.3, p.192-199, 2011.
- KAO, W. et al. A formyl peptide receptor agonist suppresses inflammation and bone damage in arthritis. **Br J Pharmacol.** v.171, n.17, p.4087-4096, 2014.
- KEILBERG, D.; OTTEMANN, K.M. How *Helicobacter pylori* senses, targets and interacts with the gastric epithelium. **Environ Microbiol.** v.18, n.3, p.791-806, 2016.
- KELLEY, J.R.; DUGGAN, J.M. Gastric cancer epidemiology and risk factors. **J Clin Epidemiol.** v.56, n.1, p.1-9, 2003.
- KHAU, T. et al. Annexin-1 signals mitogen-stimulated breast tumor cell proliferation by activation of the formyl peptide receptors (FPRs) 1 and 2. **FASEB J.** v.25, n.2, p.483-496, 2011.
- KIM, S.Y. et al. Validation of circulating miRNA biomarkers for predicting lymph node metastasis in gastric cancer. **J Mol Diagn.** v.15, n.5, p.661-669, 2013.
- KIM, Y.K. et al. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. **Nucleic Acids Res.** v.37, n.5, p.1672-1681, 2009.
- KORKAYA, H.; WICHA, M.S. Inflammation and autophagy conspire to promote tumor growth. **Cell Cycle.** v.10, n.16, p.2623-2624, 2011.
- KOSEKI, H. et al. Enhanced expression of lipocortin-1 as a new immunosuppressive protein in cancer patients and its influence on reduced in vitro peripheral blood lymphocyte response to mitogens. **Surg Today.** v.27, n.1, p.30-39, 1997.
- KURDISTANI, S.K. Histone modifications as markers of cancer prognosis: a cellular view. **Br J Cancer.** v.97, n.1, p.1-5, 2007.
- 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, J.Y. et al. Clinical Significance of the Prognostic Nutritional Index for Predicting Short- and Long-Term Surgical Outcomes After Gastrectomy: A Retrospective Analysis of 7781 Gastric Cancer Patients. **Medicine (Baltimore).** v.95, n.18, p.e3539, 2016.
- LEE, S.J. et al. Genetic polymorphism of miR-196a as a prognostic biomarker for early breast cancer. **Anticancer Res.** v.34, n.6, p.2943-2949, 2014.
- LETLEY, D.P. et al. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem.** v.278, n.29, p.26734-26741, 2003.
- LI, C. et al. MicroRNA-409-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting PHF10 in gastric cancer. **Cancer Lett.** v.320, n.2, p.189-197, 2012.
- LI, J. et al. MicroRNA-223 functions as an oncogene in human gastric cancer by targeting

FBXW7/hCdc4. **J Cancer Res Clin Oncol.** v.138, n.5, p.763-774, 2012.

LI, J.H. et al. Inhibition of microRNA-196a might reverse cisplatin resistance of A549/DDP non-small-cell lung cancer cell line. **Tumour Biol.** v.37, n.2, p.2387-2394, 2016.

LI, N. et al. Increased miR-222 in H. pylori-associated gastric cancer correlated with tumor progression by promoting cancer cell proliferation and targeting RECK. **FEBS Lett.** v.586, n.6, p.722-728, 2012.

LI, N. et al. miR-222/VGLL4/YAP-TEAD1 regulatory loop promotes proliferation and invasion of gastric cancer cells. **Am J Cancer Res.** v.5, n.3, p.1158-1168, 2015.

LI, Z. et al. miR-495 and miR-551a inhibit the migration and invasion of human gastric cancer cells by directly interacting with PRL-3. **Cancer Lett.** v.323, n.1, p.41-47, 2012.

LIAO, Y.L. et al. Transcriptional regulation of miR-196b by ETS2 in gastric cancer cells. **Carcinogenesis.** v.33, n.4, p.760-769, 2012.

LIM, B. et al. Genomic and epigenomic heterogeneity in molecular subtypes of gastric cancer. **World J Gastroenterol.** v.22, n.3, p.1190-1201, 2016.

LIM, L.H.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J.** v.21, n.4, p.968-975, 2007.

LIU, L. et al. Diagnostic value of circulating microRNAs for gastric cancer in Asian populations: a meta-analysis. **Tumour Biol.** v.35, n.12, p.11995-12004, 2014.

LIU, W. et al. miR-221 and miR-222 Simultaneously Target RECK and Regulate Growth and Invasion of Gastric Cancer Cells. **Med Sci Monit.** v.21, p.2718-2725, 2015.

LUTHRA, R. et al. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. **Oncogene.** v.27, n.52, p.6667-6678, 2008.

MAEKITA, T. et al. High levels of aberrant DNA methylation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. **Clin Cancer Res.** v.12, n.3 Pt 1, p.989-995, 2006.

MAKHLOUGH, A. et al. A Comparison between Hybrid Therapy and Standard Triple Therapy for Helicobacter pylori Eradication in Patients with Uremia: A Randomized Clinical Trial. **Middle East J Dig Dis.** v.8, n.1, p.39-43, 2016.

MARSHALL BJ, W.J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet.** v.1, n.8336, p.1273-1275, 1983.

MATSUZAKI, J.; SUZUKI, H. Role of MicroRNAs-221/222 in Digestive Systems. **J Clin Med.** v.4, n.8, p.1566-1577, 2015.

MCARDLE, P.A. et al. Systemic inflammatory response, prostate-specific antigen and survival in patients with metastatic prostate cancer. **Urol Int.** v.77, n.2, p.127-129, 2006.



- MERGA, J.Y. et al. Review: Importance of the alternative NF-kappaB activation pathway in inflammation-associated gastrointestinal carcinogenesis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** p.ajpgi 00026 02016, 2016.
- MEZA-JUNCO, J.; AU, H.J.; SAWYER, M.B. Critical appraisal of trastuzumab in treatment of advanced stomach cancer. **Cancer Manag Res.** v.3, p.57-64, 2011.
- MIHMANLI, M. et al. Recent developments and innovations in gastric cancer. **World J Gastroenterol.** v.22, n.17, p.4307-4320, 2016.
- MIMURO, H. et al. Grb2 is a key mediator of helicobacter pylori CagA protein activities. **Mol Cell.** v.10, n.4, p.745-755, 2002.
- MIRBASE. miRBase: the microRNA database. Release 21. June 2014.
- MOGHANIBASHI, M. et al. Proteomics of a new esophageal cancer cell line established from Persian patient. **Gene.** v.500, n.1, p.124-133, 2012.
- MORELLI, G. et al. Microevolution of Helicobacter pylori during prolonged infection of single hosts and within families. **PLoS Genet.** v.6, n.7, p.e1001036, 2010.
- NARDONE, G. et al. Helicobacter pylori and epigenetic mechanisms underlying gastric carcinogenesis. **Dig Dis.** v.25, n.3, p.225-229, 2007.
- NOMURA, H. et al. Down-regulation of plasma membranous Annexin A1 protein expression in premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with epithelial differentiation. **J Cancer Res Clin Oncol.** v.135, n.7, p.943-949, 2009.
- OTTO, W. et al. The enlightenment of bladder cancer treatment: origin and progress of photodynamic diagnosis. **Future Oncol.** v.7, n.9, p.1057-1066, 2011.
- PAJAVAND, H. et al. High Frequency of vacA s1m2 Genotypes Among Helicobacter pylori Isolates From Patients With Gastroduodenal Disorders in Kermanshah, Iran. **Jundishapur J Microbiol.** v.8, n.11, p.e25425, 2015.
- PANDEY, R. et al. Helicobacter pylori and gastric cancer. **Asian Pac J Cancer Prev.** v.11, n.3, p.583-588, 2010.
- PECQUEUX, M. et al. Free intraperitoneal tumor cells and outcome in gastric cancer patients: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget.** v.6, n.34, p.35564-35578, 2015.
- PIETRANI, N.T. et al. Annexin A1 concentrations is decreased in patients with diabetes type 2 and nephropathy. **Clin Chim Acta.** v.436, p.181-182, 2014.
- PIN, A.L. et al. Annexin-1-mediated endothelial cell migration and angiogenesis are regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced inhibition of miR-196a expression. **J Biol Chem.** v.287, n.36, p.30541-30551, 2012.
- POLK, D.B.; PEEK, R.M., JR. Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. **Nat Rev Cancer.** v.10, n.6, p.403-414, 2010.

POLLI-LOPES, A.C. et al. Myenteric denervation in gastric carcinogenesis: differential modulation of nitric oxide and annexin-A1. **Int J Clin Exp Pathol.** v.6, n.1, p.13-23, 2013.

PREVETE, N. et al. The formyl peptide receptor 1 exerts a tumor suppressor function in human gastric cancer by inhibiting angiogenesis. **Oncogene.** v.34, n.29, p.3826-3838, 2015.

QIN, C. et al. Cardioprotective potential of annexin-A1 mimetics in myocardial infarction. **Pharmacol Ther.** v.148, p.47-65, 2015.

RANJBAR, R. et al. Helicobacter pylori in bottled mineral water: genotyping and antimicrobial resistance properties. **BMC Microbiol.** v.16, p.40, 2016.

RASCH, S.; ALGUL, H. A clinical perspective on the role of chronic inflammation in gastrointestinal cancer. **Clin Exp Gastroenterol.** v.7, p.261-272, 2014.

RAYMOND, J.; THIBERGE, J.M.; DAUGA, C. Diagnosis of Helicobacter pylori recurrence: relapse or reinfection? Usefulness of molecular tools. **Scand J Gastroenterol.** v.51, n.6, p.672-678, 2016.

RICARTE FILHO, J.C.; KIMURA, E.T. [MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer]. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v.50, n.6, p.1102-1107, 2006.

RICCI, V.; ROMANO, M.; BOQUET, P. Molecular cross-talk between Helicobacter pylori and human gastric mucosa. **World J Gastroenterol.** v.17, n.11, p.1383-1399, 2011.

ROHWER, N. et al. Annexin A1 sustains tumor metabolism and cellular proliferation upon stable loss of HIF1A. **Oncotarget.** v.7, n.6, p.6693-6710, 2016.

RONDEPIERRE, F. et al. Proteomic studies of B16 lines: involvement of annexin A1 in melanoma dissemination. **Biochim Biophys Acta.** v.1794, n.1, p.61-69, 2009.

ROSSI, A.F. et al. Deregulation of annexin-A1 and galectin-1 expression in precancerous gastric lesions: intestinal metaplasia and gastric ulcer. **Mediators Inflamm.** v.2014, p.478138, 2014.

SAITO, Y. et al. Dysfunctional gastric emptying with down-regulation of muscle-specific microRNAs in Helicobacter pylori-infected mice. **Gastroenterology.** v.140, n.1, p.189-198, 2011.

SATO, Y. et al. Up-regulated Annexin A1 expression in gastrointestinal cancer is associated with cancer invasion and lymph node metastasis. **Exp Ther Med.** v.2, n.2, p.239-243, 2011.

SCHMIDT, N. et al. Missing gastric cancer in dyspepsia. **Aliment Pharmacol Ther.** v.21, n.7, p.813-820, 2005.

SEWALD, X. et al. Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. **Cell Host Microbe.** v.3, n.1, p.20-29, 2008.

SHACTER, E.; WEITZMAN, S.A. Chronic inflammation and cancer. **Oncology (Williston Park)**. v.16, n.2, p.217-226, 229; discussion 230-212, 2002.

SILISTINO-SOUZA, R. et al. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. **Int J Cancer**. v.120, n.12, p.2582-2589, 2007.

SINHA, P. et al. Increased expression of annexin I and thioredoxin detected by two-dimensional gel electrophoresis of drug resistant human stomach cancer cells. **J Biochem Biophys Methods**. v.37, n.3, p.105-116, 1998.

STRAATMAN, J. et al. Minimally Invasive Versus Open Total Gastrectomy for Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Short-Term Outcomes and Completeness of Resection : Surgical Techniques in Gastric Cancer. **World J Surg**. v.40, n.1, p.148-157, 2016.

SU, N. et al. Increased expression of annexin A1 is correlated with K-ras mutation in colorectal cancer. **Tohoku J Exp Med**. v.222, n.4, p.243-250, 2010.

SUGIMOTO, M.A. et al. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. **J Immunol Res**. v.2016, p.8239258, 2016.

SUH, Y.E. et al. MicroRNA-196a promotes an oncogenic effect in head and neck cancer cells by suppressing annexin A1 and enhancing radioresistance. **Int J Cancer**. v.137, n.5, p.1021-1034, 2015.

SUN, Q. et al. Hsa-mir-27a genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility through affecting miR-27a and target gene expression. **Cancer Sci**. v.101, n.10, p.2241-2247, 2010.

SUNDRUD, M.S. et al. Inhibition of primary human T cell proliferation by Helicobacter pylori vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.101, n.20, p.7727-7732, 2004.

SUO, A. et al. Proteome analysis of the effects of sorafenib on human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. **Med Oncol**. v.29, n.3, p.1827-1836, 2012.

TALARICO, S. et al. Pediatric Helicobacter pylori isolates display distinct gene coding capacities and virulence gene marker profiles. **J Clin Microbiol**. v.47, n.6, p.1680-1688, 2009.

TOMBOLA, F. et al. The Helicobacter pylori VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. **J Clin Invest**. v.108, n.6, p.929-937, 2001.

TOUATI, E. When bacteria become mutagenic and carcinogenic: lessons from H. pylori. **Mutat Res**. v.703, n.1, p.66-70, 2010.

TSAI, M.M. et al. MicroRNA-196a/-196b promote cell metastasis via negative regulation of radixin in human gastric cancer. **Cancer Lett**. v.351, n.2, p.222-231, 2014.

VANNELLA, L.; LAHNER, E.; ANNIBALE, B. Risk for gastric neoplasias in patients with

chronic atrophic gastritis: a critical reappraisal. **World J Gastroenterol.** v.18, n.12, p.1279-1285, 2012.

VINAGRE, R.M. et al. Determination of strains of *Helicobacter pylori* and of polymorphism in the interleukin-8 gene in patients with stomach cancer. **Arq Gastroenterol.** v.48, n.1, p.46-51, 2011.

VISHWANATHA, J.K.; SALAZAR, E.; GOPALAKRISHNAN, V.K. Absence of annexin I expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas and cell lines. **BMC Cancer.** v.4, p.8, 2004.

VOISIN, S.N. et al. Identification of novel molecular targets for endometrial cancer using a drill-down LC-MS/MS approach with iTRAQ. **PLoS One.** v.6, n.1, p.e16352, 2011.

WANG, H. et al. Three dysregulated microRNAs in serum as novel biomarkers for gastric cancer screening. **Med Oncol.** v.31, n.12, p.298, 2014.

WEN, S.; MOSS, S.F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer Lett.** v.282, n.1, p.1-8, 2009.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol.** v.11, n.3, p.228-234, 2009.

WONG, B.C. et al. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. **JAMA.** v.291, n.2, p.187-194, 2004.

WU, C.M. et al. Identification of differential gene expression between intestinal and diffuse gastric cancer using cDNA microarray. **Oncol Rep.** v.15, n.1, p.57-64, 2006.

WU, L.; BELASCO, J.G. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. **Mol Cell.** v.29, n.1, p.1-7, 2008.

YAMAOKA, Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** v.7, n.11, p.629-641, 2010.

YOSHIDA, K. et al. Proteomic differential display analysis for TS-1-resistant and -sensitive pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Anticancer Res.** v.31, n.6, p.2103-2108, 2011.

YU, G. et al. Tissue microarray analysis reveals strong clinical evidence for a close association between loss of annexin A1 expression and nodal metastasis in gastric cancer. **Clin Exp Metastasis.** v.25, n.7, p.695-702, 2008.

YUAN, Y. et al. ANXA1 inhibits miRNA-196a in a negative feedback loop through NF- $\kappa$ B and C-Myc to reduce breast cancer proliferation. **Oncotarget.** 2016.

ZARRILLI, R.; RICCI, V.; ROMANO, M. Molecular response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*-induced cell damage. **Cell Microbiol.** v.1, n.2, p.93-99, 1999.

ZHANG, J. et al. Trends in mortality from cancers of the breast, colon, prostate, esophagus, and stomach in East Asia: role of nutrition transition. **Eur J Cancer Prev.** v.21, n.5, p.480-489, 2012.

ZHANG, Y.; REINBERG, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. **Genes Dev.** v.15, n.18, p.2343-2360, 2001.

ZHANG, Z. et al. miR-27 promotes human gastric cancer cell metastasis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. **Cancer Genet.** v.204, n.9, p.486-491, 2011.

ZHANG, Z.Q. et al. Identification of Annexin A1 protein expression in human gastric adenocarcinoma using proteomics and tissue microarray. **World J Gastroenterol.** v.19, n.43, p.7795-7803, 2013.

ZHAO, X.; YANG, L.; HU, J. Down-regulation of miR-27a might inhibit proliferation and drug resistance of gastric cancer cells. **J Exp Clin Cancer Res.** v.30, p.55, 2011.

ZHENG, G. et al. A two-microRNA signature as a potential biomarker for early gastric cancer. **Oncol Lett.** v.7, n.3, p.679-684, 2014.

ZHU, F. et al. Nuclear localization of annexin A1 correlates with advanced disease and peritoneal dissemination in patients with gastric carcinoma. **Anat Rec (Hoboken).** v.293, n.8, p.1310-1314, 2010.

ZHUANG, H. et al. [Association between hepatitis B virus infection and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis]. **Hum Reprod.** v.22, n.6, p.416-419, 2014.

*Anexos*

## Anexos

### Anexo 1.

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP-IBILCE.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                             |                                        |                        |                                |  |  |               |                                         |  |                                |                           |                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|--------------------------------|--|--|---------------|-----------------------------------------|--|--------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| <b>INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS<br/>LETRAS E CIÊNCIAS<br/>EXATAS/CAMPUS DE SÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |                                        |                        |                                |  |  |               |                                         |  |                                |                           |                                        |
| <b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |                                        |                        |                                |  |  |               |                                         |  |                                |                           |                                        |
| <b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b><br><br><b>Título da Pesquisa:</b> AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ANEXINA-A1 NO PADRÃO DE CITOCINAS E NA EXPRESSÃO DE NF- $\kappa$ B E microRNAs EM LINHAGEM DE CÂNCER GÁSTRICO.<br><b>Pesquisador:</b> Nathália Maciel Maniezzo<br><b>Área Temática:</b><br><b>Versão:</b> 1<br><b>CAAE:</b> 06185212.7.0000.5466<br><b>Instituição Proponente:</b> Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                             |                                        |                        |                                |  |  |               |                                         |  |                                |                           |                                        |
| <b>DADOS DO PARECER</b><br><br><b>Número do Parecer:</b> 122.117<br><b>Data da Relatoria:</b> 10/09/2012                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                             |                                        |                        |                                |  |  |               |                                         |  |                                |                           |                                        |
| <b>Apresentação do Projeto:</b><br>O projeto está bem fundamentado em literatura, contendo todos os itens recomendados como introdução, objetivos, metodologia, riscos e benefícios, cronograma de execução e bibliografia. Trata de um importante tema, que é o câncer gástrico. Diversos estudos já comprovaram a relação entre inflamação crônica e o câncer, sendo o fator nuclear kappa eta (NF- $\kappa$ B) considerado um componente central durante o processo inflamatório, independente de seu fator etiológico. Alguns estudos correlacionaram a ativação da expressão do NF- $\kappa$ B com a resistência celular à apoptose e estímulo da proliferação celular, desta forma a inibição deste fator de transcrição pode apresentar um papel importante a ser estudado como nova forma de tratamento para cânceres. Outro aspecto relacionado ao câncer é a expressão desregulada de microRNAs (miRNAs), que apresentam papel importante na regulação da expressão gênica influenciando processos fisiológicos normais da célula bem como aqueles ligados à doenças, como o câncer. A Anexina-A1 é uma proteína antiinflamatória e com ação antiproliferativa. Estudos recentes comprovaram que esta proteína se liga ao NF- $\kappa$ B impedindo sua ação, apresentando uma ação anticâncer em modelo de câncer de cólon. Desta forma o presente trabalho pretende avaliar in vitro, em linhagem tumoral gástrica (AGS), o efeito do tratamento com Anexina A1 sobre o padrão de citocinas e a expressão do gene NF- $\kappa$ B e miRNAs, assim como fazer a predição de genes-alvo dos miRNAs com expressão alterada e posteriormente validar in vivo a expressão desses RNAs em amostras de pacientes com câncer gástrico. O trabalho será realizado através da linhagem celular tumoral gástrica AGS (Cell Bank, Rio Janeiro-RJ). As células serão |                                             |                                        |                        |                                |  |  |               |                                         |  |                                |                           |                                        |
| <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="2"><b>Endereço:</b> CRISTÓVÃO COLOMBO 18979999</td> <td><b>CEP:</b> 15.054-000</td> </tr> <tr> <td><b>Bairro:</b> JARDIM NAZARETH</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td><b>UF:</b> SP</td> <td><b>Município:</b> SÃO JOSÉ DO RIO PRETO</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Telefone:</b> (17)3321-2455</td> <td><b>Fax:</b> (17)3321-2500</td> <td><b>E-mail:</b> consetat@bilce.unesp.br</td> </tr> </table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>Endereço:</b> CRISTÓVÃO COLOMBO 18979999 |                                        | <b>CEP:</b> 15.054-000 | <b>Bairro:</b> JARDIM NAZARETH |  |  | <b>UF:</b> SP | <b>Município:</b> SÃO JOSÉ DO RIO PRETO |  | <b>Telefone:</b> (17)3321-2455 | <b>Fax:</b> (17)3321-2500 | <b>E-mail:</b> consetat@bilce.unesp.br |
| <b>Endereço:</b> CRISTÓVÃO COLOMBO 18979999                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                             | <b>CEP:</b> 15.054-000                 |                        |                                |  |  |               |                                         |  |                                |                           |                                        |
| <b>Bairro:</b> JARDIM NAZARETH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                             |                                        |                        |                                |  |  |               |                                         |  |                                |                           |                                        |
| <b>UF:</b> SP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>Município:</b> SÃO JOSÉ DO RIO PRETO     |                                        |                        |                                |  |  |               |                                         |  |                                |                           |                                        |
| <b>Telefone:</b> (17)3321-2455                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>Fax:</b> (17)3321-2500                   | <b>E-mail:</b> consetat@bilce.unesp.br |                        |                                |  |  |               |                                         |  |                                |                           |                                        |

cultivadas e serão realizados dois grupos de ensaios celulares para tratamento da linhagem celular AGS. No grupo 1 as células tumorais gástricas serão tratadas com ANXA12-26, enquanto no grupo 2 as células receberão LPS (lipopolissacarídeo) antes do tratamento com a ANXA12-26. Será estabelecido o período de cultivo da linhagem para avaliação dos

parâmetros celulares que serão analisados através dos testes descritos a seguir: morfologia e crescimento celular; análise da expressão do NF- $\kappa$ B e miRNAs; avaliação do Ciclo Celular: Viabilidade, Proliferação Celular e Apoptose; Ensaios Multiplex para análise de citocinas: Avaliar os padrões de citocinas: Interleucinas 1beta (IL-1 beta), 4 (IL-4), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 11 (IL-11), 18 (IL-18) e TNF-alfa, TGF-beta, IFN-gama e VEGF nas diferentes condições experimentais pelo ensaio multiplex; Validação da expressão de miRNAs em amostras de câncer gástrico: Os miRNAs que se apresentarem diferencialmente expressos nas diferentes condições de cultura, terão sua expressão analisada por qPCR em tempo real (descrita anteriormente) através da análise do cDNA de 40 amostras de câncer gástrico humano. As amostras tumorais se encontram emblocadas em parafina e armazenadas no Hospital de Base no Serviço de Patologia; Predição de alvos regulados por miRNAs: serão utilizadas ferramentas de bioinformática disponíveis em bancos de dados públicos (como <http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>), para predição de alvos regulados por miRNAs que apresentarem expressão diferenciada nas condições de tratamentos propostas. Estas análises serão realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Patricia F. Reis (UNESP-Botucatu).

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Primário:

Avaliar os efeitos do tratamento com Anexina A1 (peptídeo ANXA12-26) em linhagem tumoral gástrica sobre o padrão de citocinas e a expressão do gene NF- $\kappa$ B e miRNAs com ação oncogênica e supressor tumoral. Posteriormente fazer a predição de genes-alvo dos miRNAs com expressão alterada e validar in vivo a expressão desses miRNAs em amostras de pacientes com câncer gástrico.

##### Objetivo Secundário:

1. Avaliar in vitro, em linhagem celular de câncer gástrico (AGS), a influência de administração de ANXA12-26 nas culturas após a indução de inflamação com LPS, sobre a modulação da expressão do NF- $\kappa$ B e de miRNAs pela técnica de qPCR em tempo real.
2. Avaliar a ocorrência de alterações na morfologia e crescimento celular de todas as condições de cultura propostas em microscópio invertido de contraste e pelo equipamento Countess Automated Cell Counter.
3. Investigar in vitro na linhagem celular AGS, as condições experimentais o ciclo celular analisando viabilidade celular, proliferação celular e apoptose por citometria de fluxo.
4. Avaliar os padrões de citocinas: Interleucinas 1beta (IL-1 beta), 4 (IL-4), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 11 (IL-

Endereço: CRISTOVÃO COLOMBO 15572-000  
Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 15.054-000  
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3221-2455 Fax: (17)3221-2500 E-mail: [conclab@bioc.unesp.br](mailto:conclab@bioc.unesp.br)



INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
LETRAS E CIÊNCIAS  
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



11), 18 (IL-18) e TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e VEGF nas diferentes condições experimentais pelo ensaio multiplex;

5. Validar a expressão dos miRNAs com expressão alterada em amostras de pacientes com câncer gástrico pela técnica de qPCR em tempo real.

6. Buscar em bancos de dados públicos, utilizando ferramentas de bioinformática, a predição de genes-alvo dos miRNAs com expressão alterada.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

O presente trabalho apresenta riscos mínimos tanto para o pesquisador quanto para os pacientes participantes da pesquisa. Serão utilizados as técnicas e equipamentos de proteção individual adequados para a realização de todos os experimentos, desta forma o risco gerado ao pesquisador será mínimo tendo em vista que será feita apenas análises de linhagem celular e tumores em parafina. Tais tumores utilizados na pesquisa já seriam

previamente removidos cirurgicamente, portanto nenhuma intervenção pós-cirúrgica será realizada nos pacientes ausentando então os mesmos de riscos adicionais durante o desenvolvimento da pesquisa.

**Benefícios:**

Com a conclusão da pesquisa acredita-se poder indicar o peptídeo da Annexina-A11 para futuros estudos in vivo em câncer gástrico devido seu poder anti-proliferativo e anti-inflamatório, bem como definir genes-alvo regulados por microRNAs e desta forma compreender com maior clareza o processo molecular envolvido na carcinogênese gástrica, contribuindo com a predição de alvos moleculares para futuros tratamentos e auxílio a

prevenção do câncer gástrico.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma tese de doutorado e a pesquisa poderá trazer importantes contribuições para a abordagem do câncer gástrico. A pesquisadora tem experiência com o tema, bem como a orientadora.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos obrigatórios estão todos apresentados, incluindo Folha de rosto e termo de concordância do Hospital de Base - setor de Patologia - de onde serão obtidas as amostras de câncer gástrico de pacientes. A pesquisadora solicita dispensa do TCLE, visto que as amostras de câncer gástrico de pacientes provenientes do Serviço de Patologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP já se encontram no arquivo do hospital e já tiveram a autorização prévia declarada dos pacientes antes do início do presente estudo. Concordamos com a dispensa do TCLE.

Endereço: CRISTOVÃO COLOMBO 18909999  
Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 13.054-000  
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3221-2495 Fax: (17)3221-2500 E-mail: naze@fbc.unesp.br

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
LETRAS E CIÊNCIAS  
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO JOSE DO RIO PRETO, 15 de Outubro de 2012

Assinado por:  
Raul Aragão Martins  
(Coordenador)

Endereço: CRISTÓVÃO COLOMBO 159799999 CEP: 15.054-000  
Bairro: JARDIM NAZARETH  
UF: SP Município: SÃO JOSE DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3221-3466 Fax: (17)3221-2500 E-mail: [scmlab@bilva.unesp.br](mailto:scmlab@bilva.unesp.br)

**Anexo 2**

Comprovante de submissão do artigo científico à revista *BMC Cancer*.

BCAN-D-16-00999

Annexin-A1/FPR1 and miR-196a contribute to the pathogenesis of gastric cancer

Nathália Maciel Maniezzo-Stuchi; Ana Flávia Teixeira Rossi; Dalísio de Santi Neto; Ana Paula Girol; Sonia Maria Olini; Ana Elizabete Silva

BMC Cancer

Dear Mrs Maniezzo-Stuchi,

Thank you for submitting your manuscript 'Annexin-A1/FPR1 and miR-196a contribute to the pathogenesis of gastric cancer' to BMC Cancer.

The submission id is: BCAN-D-16-00999

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following website:

<http://bcan.edmgr.com/>

If you have forgotten your username or password please use the "Send Login Details" link to get your login information. For security reasons, your password will be reset.

Best wishes,

Editorial Office

BMC Cancer

<http://www.biomedcentral.com/bmccancer/>