RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 17/03/2023

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

Ana Flávia Teixeira Rossi Freire

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

São José do Rio Preto
2019

Ana Flávia Teixeira Rossi Freire

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

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

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

Orientadora: Profª Drª Ana Elizabete Silva

São José do Rio Preto
2019

F866a

Freire, Ana Flávia Teixeira Rossi

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

123 f. : il., tabs.

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

Orientadora: Ana Elizabete Silva

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Ana Flávia Teixeira Rossi Freire

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

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

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

Comissão Examinadora

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

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

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

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

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

São José do Rio Preto
25 de julho de 2019

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muito obrigada!

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

José de Alencar

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

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

Lista de figuras Capítulo I

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

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

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

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

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

Lista de figuras Capítulo II

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

Lista de tabelas Capítulo I

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

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

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

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

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

1.1 Câncer Gástrico 20

1.2 Inflamação: *Helicobacter pylori* e câncer gástrico 22

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

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

2 OBJETIVOS 39

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

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

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

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

5 DISCUSSÃO 100

6 CONCLUSÕES..... 109

REFERÊNCIAS..... 110

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer gástrico

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WONG, N.; WANG, X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. **Nucleic Acids Res***,* v. 43, p. D146-D152, 2015.

WU, Y.; ZHOU, B.P. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. **Br J Cancer,** v.102, n.4, p.639-644, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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