



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E
CIÊNCIAS MÉDICAS

**PAPEL DO GENE *PIWIL1* COMO POSSÍVEL AGENTE NO PROCESSO DE
TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NO CÂNCER GÁSTRICO**

Juliana Albuquerque Pinto Paiva

BELÉM-PA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E
CIÊNCIAS MÉDICAS

**PAPEL DO GENE *PIWIL1* COMO POSSÍVEL AGENTE NO PROCESSO DE
TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NO CÂNCER GÁSTRICO**

Autor: Juliana Albuquerque Pinto Paiva

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

BELÉM - PA

2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

A345p Albuquerque Pinto Paiva, Juliana
PAPEL DO GENE PIWIL1 COMO POSSÍVEL AGENTE NO
PROCESSO DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NO
CÂNCER GÁSTRICO / Juliana Albuquerque Pinto Paiva. — 2019.
89 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. André Salim Khayat
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Oncologia e Ciências Médicas, Núcleo de Pesquisas em Oncologia,
Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Oncologia. 2. CRISPR-Cas9. 3. PIWIL1. 4. Câncer
Gástrico. 5. Transição Epitélio-Mesenquimal. I. Título.

CDD 616.994

**PAPEL DO GENE *PIWILI* COMO POSSÍVEL AGENTE NO PROCESSO DE
TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NO CÂNCER GÁSTRICO**

Juliana Albuquerque Pinto Paiva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Aprovado em: 12/02/2019

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat

Universidade Federal do Pará – UFPA

Profa. Dra. Andrea Kely Campos Ribeiro dos Santos

Universidade Federal do Pará – UFPA

Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno

Universidade Federal do Pará – UFPA

Profa. Dra. Samia Demachki

Universidade Federal do Pará – UFPA

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTE FINANCIADORA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA

NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA - NPO

FUNDAÇÃO AMAZÔNIA DE AMPARO A ESTUDOS E PESQUISAS - FAPESPA

UNIVERSIDADE FRIEDRICH SCHILLER DE JENA - FSU

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS - IEC

AGRADECIMENTOS

Não posso deixar de começar agradecendo a Ele, meu Deus, Senhor e salvador, por acalmar meu coração, por renovar minhas forças e esperanças para que eu continuasse a ir atrás dos meus sonhos, para que eu continuasse estudando apesar do cansaço, para que eu não desistisse em todas as vezes que as coisas se enrolaram de uma forma inimaginável, que esteve em todos os momentos difíceis iluminando meu caminho e me acompanhou até aqui. Nunca estive sozinha.

Quero agradecer à minha aldeia: minha mãe, Ana Cláudia, e minha irmã, Adriana, que ficaram com a Ana sempre que precisei assistir aula, fazer experimentos ou qualquer coisa que fosse. A melhor e mais amorosa rede de apoio que eu poderia ter, por causa delas pude seguir mais tranquila e com menos culpa. À minha mãe que foi comigo pro laboratório para que eu desse de mamar nos intervalos, que fez o que podia e o que não podia pra ir até minha casa ficar com a “godica” (e de quebra fazia faxina), que ensinou a Ana a dançar e a comer “falelos” e tapioca. À Velha pelos cafés, pelas conversas e sonhos divididos, por ensinar a Ana a gritar (queria poder usar um emoji aqui), por ser a tia doida e divertida, pelas experiências sensoriais mais variadas e pelas melhores sinapses. Eu vou ser eternamente grata a vocês duas.

Ao Gustavo, meu marido, meu amor, meu parceiro, meu maior incentivador que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu mesma duvidei, que literalmente não me permitiu desistir tantas vezes, que sempre tinha palavras como “a gente dá um jeito”, “tu és fera”, “você vai conseguir”, “deixa isso e vamo assistir alguma coisa”, “trouxe comida” e muitos abraços e beijos acolhedores. Que sempre foi pai, sempre fez a minha ausência não ser um peso, que sempre se responsabilizou pelas coisas e que divide comigo tudo dessa vida doida. Que passou comigo por cada fase ruim e boa, por cada derrota e cada vitória, pelas lágrimas e pelos sorrisos, por sonhar comigo e acreditar em cada dia dessa jornada desde o início. Você é meu oásis, meu lugar preferido, te amo.

À ela, minha godica maneira, minha razão, minha filha Ana Luísa. Obrigada, meu amor, por me reconstruir, por me revirar, por me reposicionar no mundo e me tirar da minha bolha. Obrigada por confirmar meus sonhos e por me fazer ver o que é essencial pra mim e pra minha jornada. Obrigada pelos sorrisos, pelas dancinhas, pelo descabelo e pelos abraços e beijinhos que foram tão essenciais nos dias fáceis e nos dias difíceis. Obrigada por mostrar que eu sou mais forte do que pensava. Eu te amo de uma forma que não consigo descrever, a tua vinda me transformou.

À minha família como um todo que sempre foi apoio, descanso e refrigério. Ao meu amado pai, Honório, pelos conselhos e por ser o suporte racional, meu irmão, Paulo, pelas caronas e “iiiiiihs”, por, junto com a Tia Clara, tomar conta da pitita pra eu poder escrever, por ser o tio Ponhonhonho doidinho. Todo mundo que sempre acreditou em mim e me ajudou de todo jeito que conseguiu. Amo vocês todos!

Ao pessoal do laboratório por sempre estar presente de alguma forma, no café, na hora de chorar as mágoas e experimentos furados (precisava de um emoji aqui também), na hora de comemorar a chegada de material, no compartilhar células e soluções pra cultura, nas conversas sobre coisas científicas e não científicas (provavelmente eram maioria), por sempre responderem aos “envia pra mim?”, por todas as risadas e por fazerem os dias bem mais interessantes. Obrigada pela ajuda quando engravidei, por ligarem equipamentos e preparem

soluções, por carregarem coisas e por aguentarem a meu humor gravidítico. Depois que a Ana nasceu vocês continuaram ajudando, seja ficando com ela, seja fazendo uma manutenção ou só escutando as revoltas mesmo. Vocês tornaram a jornada mais leve.

À Ad, minha companheira de experimentos curtos e longos, de desabafos, de lanche, de carro, que compartilhou comigo cada dor e cada amor dessa vida na ciência brasileira e de fora dela também. Obrigada por ter segurado as pontas quando a Ana nasceu e em vários outros momentos, obrigada por toda doçura, por planejar junto comigo, por me apoiar e me entender. Te amo, neném.

Ao André, meu orientador, por toda compreensão e flexibilidade quando engravidei e que continuou depois que a Ana nasceu. Obrigada pela amizade, pelo conhecimento compartilhado, pela orientação, por sempre me deixar livre quanto ao planejamento da minha rotina e pelas comidas também que foram muito importantes.

À Taíssa por sempre estar presente, por dar dicas, por mostrar caminhos, por pensar em soluções, por explicar e ler incansavelmente, por toda ajuda e por todos os “vai dar certo” e “isso tá esquisito” ditos durante esse tempo todo (não foram poucos). Foram tantas conversas, tantos desabafos e até participação na descoberta da godica. Obrigada por tudo que fizeste por mim, xuxu que colhi na vida.

Aos professores e colaboradores do NPO, todos que entraram no meu caminho e que me trouxeram algo de alguma forma. Conhecimento, informação, exemplo, suporte e acolhimento. Obrigada a todos vocês que participam de forma indireta, mas tão importante quanto.

Obrigada a todos que cruzaram meu caminho, que contribuíram com meu crescimento de todas as formas e que fazem parte da Juliana eu sou hoje.

Com muita emoção meu “Muito Obrigada!”

RESUMO

O gene *PIWI-LIKE PROTEIN 1 (PIWIL1)* surgiu como um alvo atraente para o câncer gástrico, uma vez que estudos têm demonstrado que a proteína PIWIL1 é expressa em níveis aumentados em tecidos cancerígenos, células-tronco e células germinativas, porém é ausente em tecidos somáticos normais, caracterizando-a como uma proteína-alvo muito interessante para o tratamento desta neoplasia, visto que a maioria das células não cancerígenas não seria afetada por efeitos citotóxicos. Embora informações relevantes sobre o possível papel da PIWIL1 na carcinogênese do câncer gástrico sejam fornecidas pela literatura atual, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo carcinogênico permanecem pouco esclarecidos. Portanto, com o objetivo de investigar os mecanismos moleculares pelos quais a PIWIL1 confere vantagens às células cancerígenas, a tecnologia de CRISPR/Cas9 foi empregada, a fim de realizar o *knockout* permanente do gene *PIWIL1* na linhagem celular de câncer gástrico AGP01. Após o *knockout*, foram realizados experimentos para avaliar o efeito desta alteração molecular sobre a capacidade de migração e invasão da linhagem, bem como sobre a expressão de genes envolvidos nestes dois mecanismos celulares. Os resultados demonstraram que o *knockout* do gene *PIWIL1* causou uma diminuição significativa na capacidade de migração da AGP01 após 24 horas, assim como uma diminuição significativa na capacidade invasão celular. Além disso, os resultados de expressão gênica revelaram 26 genes (cinco superexpressos e 21 hipoexpressos – quando comparadas às linhagens antes e após o *knockout*) que codificam proteínas envolvidas nos processos celulares de invasão e migração. De acordo com a literatura atual, nove desses 26 genes (*DOCK2*, *ZNF503*, *PDE4D*, *ABL1*, *ABL2*, *LPAR1*, *SMAD2*, *WASF3* e *DACHI*) possivelmente estão relacionados aos mecanismos utilizados pela PIWIL1 para promover efeitos carcinogênicos relacionados à migração e à invasão, uma vez que suas funções são consistentes com a alteração observada (superexpresso ou hipoexpresso após o *knockout*). Em conjunto, esses dados reforçam a ideia de que a PIWIL1 deve desempenhar um papel crucial na via de sinalização do câncer gástrico, regulando vários genes envolvidos nos processos de migração e invasão, portanto, seu uso como alvo terapêutico pode gerar resultados promissores no tratamento deste tipo de câncer.

Palavras-chave: CRISPR-Cas9, PIWIL1, Câncer Gástrico, Migração, Invasão.

ABSTRACT

The *PIWI-LIKE PROTEIN 1 (PIWIL1)* gene has emerged as an attractive target for gastric cancer, as studies have shown that PIWIL1 protein is expressed at increased levels in cancer tissues, stem cells and germ cells, but it has been shown to be absent in normal somatic tissues. This means that it could be a potential target for therapy, since most non-cancer cells would not be affected by cytotoxic effects. Although relevant information on the possible role of PIWIL1 in the carcinogenesis of gastric cancer is provided by the current literature, the molecular mechanisms involved in this carcinogenic process remain unclear. Therefore, in order to investigate the molecular mechanisms by which PIWIL1 confers advantages to cancer cells, CRISPR/Cas9 technology was employed in order to perform the permanent knockout of *PIWIL1* gene in the AGP01 gastric cancer cell line. After knockout, experiments were carried out to evaluate the effect of this molecular alteration on the migration and invasion capacity of the cell line, as well as on the expression of genes involved in these two cellular mechanisms. The results demonstrated that PIWIL1 gene knockout caused a significant decrease in the migration capacity of AGP01 after 24 hours, as well as a significant decrease in the cell invasion capacity. In addition, gene expression results revealed 26 genes (five overexpressed and 21 hypoexpressed - when comparing the cell lines before and after knockout) that encode proteins involved in invasion and migration cellular processes. According to the current literature, nine of these 26 genes (*DOCK2*, *ZNF503*, *PDE4D*, *ABL1*, *ABL2*, *LPAR1*, *SMAD2*, *WASF3* and *DACHI*) are possibly related to the mechanisms used by PIWIL1 to promote carcinogenic effects related to migration and invasion, since their functions are consistent with the observed modification (being overexpressed or hypoexpressed after knockout). Taken together, these data reinforce the idea that PIWIL1 should play a crucial role in the gastric cancer signaling pathway, regulating several genes involved in the migration and invasion processes, so its use as a therapeutic target can generate promising results in the treatment of this type of cancer.

Key words: Gastric cancer; *PIWIL1*; CRISPR-Cas9; Migration; Invasion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática das proteínas PIWI	13
Figura 2 Gene <i>PIWIL1</i>	14
Figura 3 Regulação de alguns <i>hallmarks</i> do câncer pela família PIWI	15
Figura 4 Proteína PIWI e o silenciamento de <i>Transposons</i>	16
Figura 5 Mecanismos Naturais de Sistemas <i>CRISPR</i> Microbiano em Imunidade Adaptativa	18
Figura 6 Os 10 <i>hallmarks</i> do câncer.	20
Figura 7 Esquema ilustrando quantitativamente os casos de câncer gástrico	21
Figura 8 Esquema explicativo de coloração cromossômica no M-FISH	28
Figura 9 Esquema explicativo da técnica de M-FISH	30
Figura 10 Linhagem celular AGP01 Multicolor-FISH mostrando várias alterações cromossômicas	36
Figura 11 Eletroferogramas comparando sequências da linhagem AGP01 com e sem o uso da tecnologia CRISPR-Cas9	37
Figura 12 Sequências de aminoácidos da proteína PIWIL1 do tipo selvagem e da proteína PIWIL1 após a inserção de sete adeninas pelo sistema CRISPR-Cas9	38
Figura 13 Análise da capacidade de migração da linhagem celular AGP01 com e sem o <i>knockout</i> do gene <i>PIWIL1</i>	39
Figura 14 Análise da capacidade de invasão da linhagem AGP01 com e sem o <i>knockout</i> do gene <i>PIWIL1</i>	40
Figura 15 <i>Volcano Plot</i> que compara a expressão gênica após o <i>knockout</i> permanente de <i>PIWIL1</i> na linhagem celular AGP01	41
Figura 16 Enriquecimento de vias dos mRNAs DE	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Proteínas PIWI humanas, comprimentos (aminoácidos), massa molecular, genes que as codificam, locus genômico e sinônimos.	13
Tabela 2 Sistemas de primers, com suas sequências forward (F) e reverse (R), os tamanhos dos amplicons	31
Tabela 3 Genes diferencialmente expressos envolvidos em processos celulares de invasão e migração ao comparar linhas celulares antes e após o knockout de PIWIL1.	42
Tabela Suplementar 1: <i>Membros da Subfamília PIWI</i>	64
Tabela Suplementar 2: Classificação do TNM patológico	64
Tabela Suplementar 3: Grupamento por estádios	65
Tabela Suplementar 4: Genes diferencialmente expressos (DE) quando comparados na linhagem celular antes e após o <i>knockout PIWIL1</i> .	66
Tabela Suplementar 5: Enriquecimento de vias de genes expressos diferencialmente (DE).	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PIWIL1: *Piwi like RNA-mediated gene silencing 1*

CG: Câncer Gástrico

pT: Tumor Primário

pN: Linfonodos Regionais

pM: Metástases à Distância

pTNM: TNM patológico

AGP01: Ascite Gástrica Paraense 01

DMEM/F-12: (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)

SBF: Soro Bovino Fetal

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

ANOVA: Análise de variância

piRNAs: RNAs que interagem com PIWI

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

crRNAs: RNAs CRISPR maduros curtos, RNAs CRISPR

sgRNA: RNA de guia único

M- FISH: Hibridização *In Situ* com Fluorescência Multicolor

GTG: *G-bands by Trypsin using Giemsa*

CCD: Charge-Coupled Device

tracrRNA: RNA trans-ativador

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction*

DE: Diferencialmente Expressos

CSCC: Carcinoma espinocelular cervical

HCC: Carcinoma hepatocelular

IGFBP5: *Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5*

TEM: Transição Epitélio-Mesenquimal

DICER: enzima nuclease que cliva moléculas de RNA dupla fita

DROSHA: enzima nuclease que cliva moléculas de RNA dupla fita

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 FAMÍLIA PIWI	13
1.1.1 GENE PIWIL1	14
1.2 BIOGÊNESE DOS piRNAs	15
1.3 SISTEMA CRISPR-CAS9	17
1.4 CÂNCER GÁSTRICO	19
1.4.1 GENE PIWIL1 E O CÂNCER GÁSTRICO	22
1.5 TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL	23
1.6 LINHAGENS CELULARES	24
2 APLICABILIDADE CLÍNICA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 CULTIVO CELULAR	27
4.2 M-FISH	28
4.3 <i>KNOCKOUT</i> DE PIWIL1 UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR-CAS9	30
4.4 SEQUENCIAMENTO	31
4.4.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO	32
4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO (<i>SCRATCH</i> ou <i>WOUDEN HEALING ASSAY</i>)	33
4.5.1 ANÁLISE DOS DADOS	33
4.6 ENSAIO DE INVASÃO (<i>BOYDEN CHAMBER ASSAY</i>)	33
4.6.1 ANÁLISE DOS DADOS	34
4.7 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	34
4.8 ENSAIO DE EXPRESSÃO POR MICROARRAY	34
4.9 EXPRESSÃO DIFERENCIAL E ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE	35
5 RESULTADOS	36
5.1 FISH DE 24 CORES USANDO SONDAS WCP HUMANAS	36
5.2 <i>KNOCKOUT</i> DO GENE <i>PIWIL1</i> UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR-CAS9	37
5.3 ENSAIO DE MIGRAÇÃO (<i>SCRATCH</i> ou <i>WOUND-HEALING ASSAY</i>)	38
5.4 ENSAIO DE INVASÃO (<i>BOYDEN CHAMBER ASSAY</i>)	39
5.5 mRNA ARRAY E VIAS	40
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	50
8 REFERÊNCIAS	51
9 ANEXOS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA PIWI

Os genes da família PIWI representam uma classe de genes evolutivamente conservados codificantes de proteínas que desempenham papéis importantes em diversos organismos (Kuramochi-Miyagawa, 2004) (Tabela Suplementar 1). Essas proteínas são compostas de três domínios característicos (Figura 1): o domínio *PIWI-Argonaute-Zwille* (PAZ), que se liga à extremidade 3' do RNA, o domínio intermediário (MID), que fornece um bolso de ligação para a extremidade 5', e o domínio PIWI, com dobra tipo RNase H que abriga a atividade de endonuclease (Farazi, 2008; Simon, 2011; Jinek and Doudna, 2009).

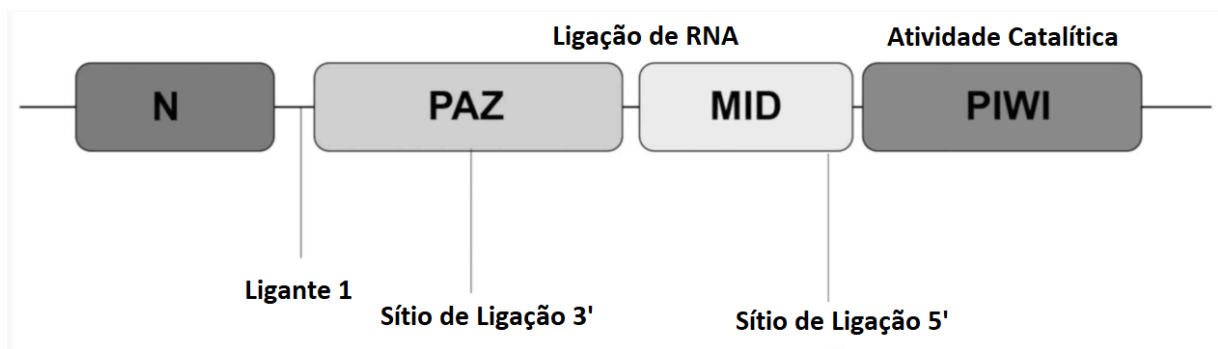


Figura 1 Representação esquemática das proteínas PIWI. PIWI, P-element-Induced Wimpy Testis; N, domínio N-terminal; PAZ, domínio PIWI-Argonaute-Zwille; MID, domínio intermediário (Adaptado de Litwin, 2017).

Existem quatro tipos de proteínas PIWI humanas: *PIWI-like protein 1* (PIWIL1, chamada também de HIWI), *PIWI-like protein 2* (PIWIL2 ou HILI), *PIWI-like protein 3* (PIWIL3 ou HIWI3) e *PIWI-like protein 4* (PIWIL4 ou HIWI2), localizadas nos cromossomos 12, 8, 22 e 11, respectivamente. Suas características estão melhores descritas na Tabela 1.

Tabela 1 Proteínas PIWI humanas, comprimentos (aminoácidos), massa molecular, genes que as codificam, locus genômico e sinônimos.

Proteína	Comprimento	Massa molecular (kDa)	Gene	Locus genômico	Sinônimos
Piwi-like protein 1	861 aa	98.5	<i>PIWIL1</i>	12q24.33	HIWI
Piwi-like protein 2	973 aa	110	<i>PIWIL2</i>	8p21.3	HILI
Piwi-like protein 3	882 aa	101	<i>PIWIL3</i>	22q11.23	HIWI3
Piwi-like protein 4	852 aa	97	<i>PIWIL4</i>	11q21	HIWI2

1.1.1 GENE PIWIL1

O gene *Piwi like RNA-mediated gene silencing 1* (*PIWIL1* também chamado de *HIWI*), é um homólogo humano da família PIWI localizado em 12q24.33 e possui 22 exons (Figura 2). Ele codifica uma proteína membro da família de proteínas Argonautas que desempenha um papel importante na auto-renovação de células germinativas e hematopoiéticas (Quiao, 2002; Sharma, 2001; Hutvagner e Simard, 2008; Zeng, 2011). Os tumores derivam de uma pequena fração de células-tronco, que possuem alta capacidade proliferativa, de autorrenovação contínua e de multi-linhagem, essas capacidades de células-tronco estão intimamente correlacionadas o gene *PIWIL1*, que tornou-se um alvo atraente para o tratamento do câncer (Assumpção, 2015; Navarro, 2015).

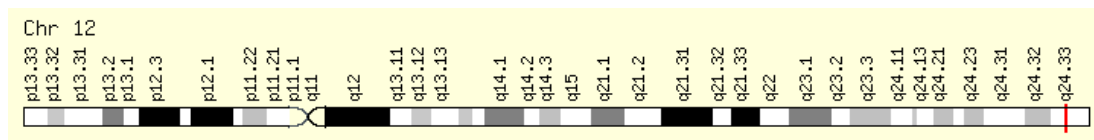


Figura 2 Gene *PIWIL1* (Fonte: <https://www.genecards.com>)

O aumento da expressão do *PIWIL1* mostrou estar relacionado à vários dos *hallmarks* do câncer propostos por Hanahan & Weinberg (2011; Figura 3) tais como baixa diferenciação, alta capacidade de migração e manutenção de características semelhantes às de células-tronco o que por sua vez contribuem para grau histológico mais grave, estágio avançado e pior evolução clínica, (Litwin, 2017; Li, 2015; Chen, 2015; Ghildiyal e Zamore, 2009, Houwing *et al.*, 2007, Suzuki *et al.*, 2012, Grochola *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). A proteína PIWIL1 é hiperexpressa em tecidos de câncer, células-tronco e células germinativas, mas tem se mostrado ausente ou com baixa expressão em tecidos somáticos normais. Isso significa que pode ser um potencial alvo para a terapia, uma vez que os efeitos citotóxicos em células não cancerosas seria consideravelmente reduzido (Assumpção, 2015; Tan, 2015; Siddiq, 2012; Siddi, 2012).

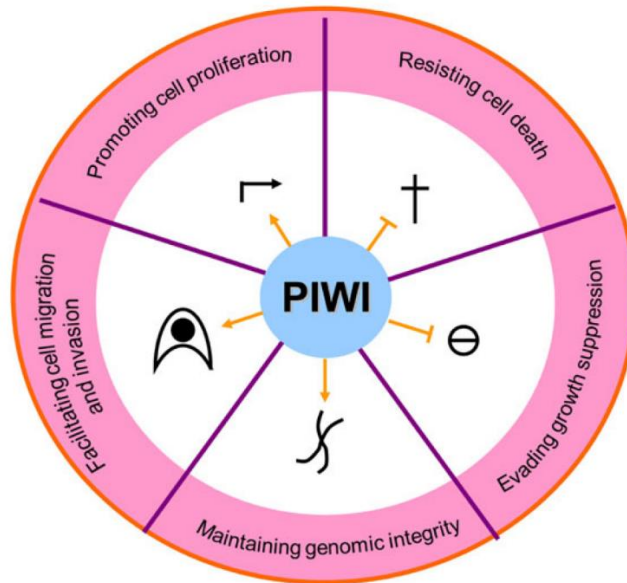


Figura 3: Regulação de alguns *hallmarks* do câncer pela família PIWI (Tan, 2015). Os hallmarks estão envolvidos na patogênese de alguns ou de todos os tipos de câncer, o que é proposto por Weinberg. As PIWIs podem contribuir para a formação de muitas características do câncer, como a promoção da divisão celular, a resistência à apoptose, evasão de supressão do crescimento, manutenção da integridade genômica, e facilitação da migração e invasão celular.

1.2 BIOGÊNESE DOS piRNAs

Os RNAs que interagem com PIWI (piRNAs) são pequenos RNAs não codificantes originários de transcritos longos de fita única que não necessitam de processamento de conversão a partir de precursores dupla fita, como os micro RNAs e os RNAs de interferência, portanto são independentes de DICER e DROSHA, sendo então necessários outros mecanismos de processamento. As vias de produção de piRNAs são chamadas de biogênese primária e secundária (Ross, 2014; Ozata, 2018).

Na biogênese primária os piRNAs se originam a partir da transcrição de seu precursor longo (prepiRNA) diretamente de loci genômicos específicos chamados de *clusters* de piRNA. Essas moléculas precursoras são então exportadas para o citoplasma onde serão processadas em um piRNA intermediário que, por sua vez, é carregado nas proteínas PIWI onde passa por diversos processos e é clivado em seu tamanho final. Na biogênese secundária os piRNAs maduros funcionam como moldes para novas moléculas através de um processo denominado Ciclo Ping-Pong, que funciona como um modelo de amplificação (Calcagno, 2017).

No processo primário de biogênese de piRNAs, as proteínas PIWI atuam como endonuclease desempenhando papel central nas células germinativas pós-natais, silenciando elementos transponíveis em loci genômicos alvo e impedindo a sua mobilização, mediando assim o silenciamento transcricional (Figura 4), que é essencial para a integridade da linhagem germinativa, além de atuarem também no silenciamento de RNAs e regulação traducional (Cox, 1998, Quiao, 2002; Ghildiyal e Zamore, 2009; Houwing *et al.*, 2007). Após o carregamento do piRNA o complexo PIWI/piRNA, chamado de complexo *RNA-induced silencing complex* (RISC), retorna ao núcleo para efetuar o processo de silenciamento de *transposons* (Sato, 2012).

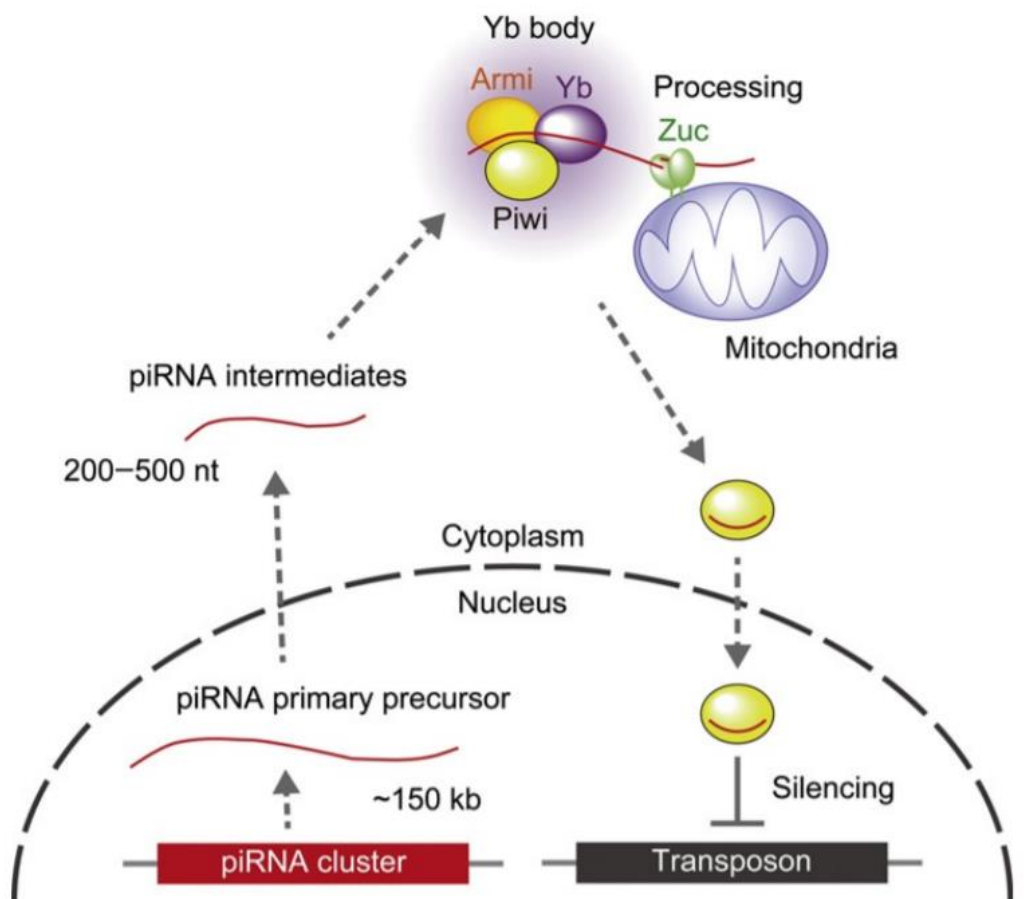


Figura 4: Proteína PIWI e o silenciamento de *transposons* (Sato, 2012). A principal biogênese do piRNA nas células foliculares do ovário: Nas células foliculares, onde geralmente *Piwi* é expresso, *Armi* associa-se a *Piwi* e faz com que ela localize *Yb*. *Yb* é o principal componente dos *Yb bodies*. Os piRNAs intermediários, parcialmente processados a partir de precursores piRNA primários (pré-piRNAs), são carregados em um complexo que compreende *Armi*, *Piwi* e *Yb bodies*, e são processados em piRNAs maduros. *Zuc*, uma endonuclease que funciona como um dímero e localiza-se nas superfícies de mitocôndrias, é necessária para o processamento primário de piRNA. Quando livre de piRNA, a PIWI está localizada no citoplasma. O complexo piRISC pode estar associado a outras proteínas nucleares para formar um complexo funcional maior (um complexo efetor nuclear) para reprimir *Transposons* no núcleo.

1.3 SISTEMA CRISPR-CAS9

Muitas bactérias e a maioria das *archaeas* evoluíram sofisticados sistemas imunes adaptativos guiados por RNA, onde sequências especiais em seu genoma são utilizadas para guiar uma enzima de corte de DNA, chamada Cas9, à sequências específicas do DNA estranho reconhecendo-o e destruindo-o, conferindo assim, imunidade adquirida contra infecção por bacteriófago e transferência de plasmídeo (Jiang, 2017) (Figura 5).

Uma tecnologia recentemente desenvolvida foi baseada nesse sistema imune adaptativo, conhecido como repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente em intervalos regulares (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats* - CRISPR) - sistema de proteína associado 9 (Cas9), reaproveitando-o como uma poderosa plataforma de direcionamento de DNA guiada por RNA para edição de genoma, perturbação no processo transcricional e modulação epigenética (Riordan, 2015; Hsu, 2014; Jinek, 2012).

Nos organismos procariontes, após a exposição a elementos genéticos invasores (processo de imunização), fragmentos do DNA estranho são integrados na matriz de espaçadores de repetição CRISPR dentro do cromossomo hospedeiro como novos espaçadores (Amitai, 2016), fornecendo um registro genético de infecção que viabiliza ao hospedeiro a prevenção contra este invasor em futuras infecções (Barrangou, 2007; Makarova, 2006). Posteriormente a esta integração ocorre a transcrição da matriz CRISPR e processamento dos transcritos precursores-CRISPR que, por meio de clivagem endonucleolítica, produz RNAs CRISPR maduros curtos (crRNAs) (Brouns, 2008).

Na extremidade 5', o crRNA contém um segmento curto de RNA, chamado espaçador, que complementa uma sequência a partir de um elemento genético estranho e a extremidade 3' contém uma parte da sequência de repetição CRISPR. A hibridização entre o espaçador crRNA e a sequência alvo externa complementar (*protospacer*) desencadeia a destruição específica da sequência invasora por Cas nucleases em uma segunda infecção (Garneau, 2010; Hale, 2009; Marraffini, 2008). Uma característica muito importante dos sistemas CRISPR-Cas é a junção de crRNAs e de proteínas Cas em complexos que "interrogam" e destroem sequências correspondentes em ácidos nucleicos estranhos (Jiang, 2015; Van der Oost, 2014; Wiedenheft, 2012).

A CRISPR-Cas9 pode ser usada tanto para realizar *knockouts* gênicos permanentes quanto para a integração de um gene (*knock-in*) permitindo assim manipular com precisão praticamente qualquer sequência genômica especificada por um pequeno trecho de RNA guia (Chen, 2016; Kawahara, 2016; Maeder, 2016; Travis, 2015; Charpentier, 2013) e elucidar a função do gene envolvido no desenvolvimento e na progressão de uma patologia (Charpentier, 2014; Doudna, 2014).

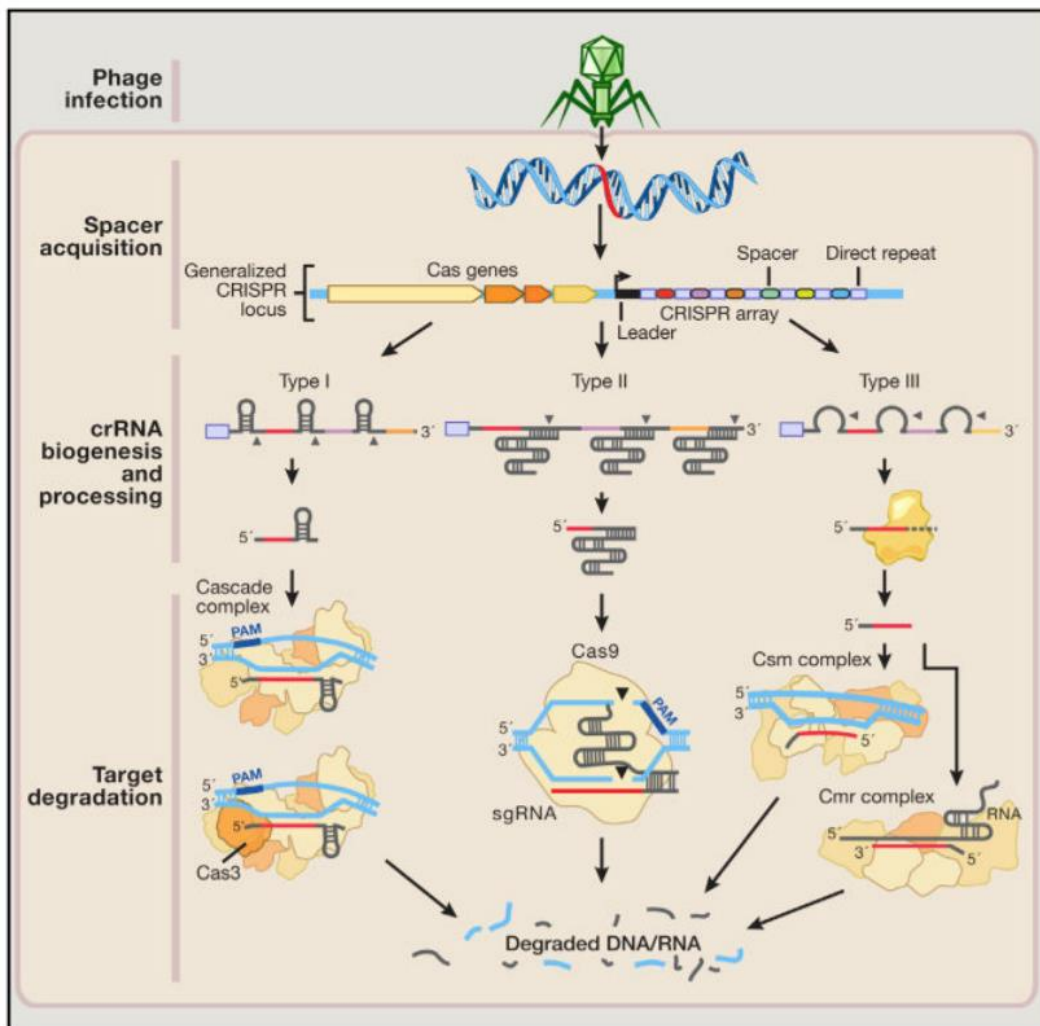


Figura 5: Mecanismos Naturais de Sistemas CRISPR Microbiano em Imunidade Adaptativa (Hsu, 2014). Após invasão da célula por elementos genéticos estranhos de bacteriófagos ou plasmídeos (etapa 1: infecção por fago), certas enzimas associadas a CRISPR (Cas) adquirem espaçadores das seqüências protospacer exógenas e as instalam no locus CRISPR dentro do genoma procariótico (etapa 2 : aquisição de espaçador). Esses espaçadores são segregados entre repetições diretas que permitem que o sistema CRISPR medie o reconhecimento de próprio e não-próprio. O arranjo CRISPR é um transcrito de RNA não codificante que é maturado enzimaticamente por meio de vias distintas que são exclusivas para cada tipo de sistema CRISPR (etapa 3: biogênese e processamento de crRNA). Nos tipos I e III CRISPR, o transcrito pré-crRNA é clivado dentro das repetições por ribonucleases associadas a CRISPR, liberando múltiplos crRNAs pequenos. Os intermediários crRNA do tipo III são ainda processados na extremidade 3' por RNases, ainda a ser identificados para produzir o transcrito completamente maduro. No CRISPR tipo II, um RNA CRISPR transativado associado (tracrRNA) hibridiza com as repetições diretas, formando um duplex de RNA que é clivado e processado por RNase III endógena e outras nucleases desconhecidas. CrRNAs maturados de sistemas CRISPR tipo I e III são então carregados em complexos de proteína efetores para reconhecimento e degradação do alvo. Nos sistemas tipo II, os híbridos crRNA-tracrRNA complexam com Cas9 para mediar a interferência. Os sistemas CRISPR do tipo I e III usam módulos de interferência multiproteína para facilitar o reconhecimento do alvo. No CRISPR tipo I, o complexo Cascade é carregado com uma molécula de crRNA, constituindo um complexo de vigilância cataliticamente inerte que reconhece o DNA alvo.

Além disso, a tecnologia de endonuclease programável permite examinar ao mesmo tempo a função de múltiplos genes em um único experimento (Cong, 2013), acelerando a compreensão de processos patológicos que envolvem grandes conjuntos de genes ou mutações, como o desenvolvimento de tumores. Utilizando bibliotecas de RNA de guia único (sgRNA), é possível identificar genes de alvo de droga ou de resistência, como novos supressores tumorais ou oncogenes, assim como avaliar rapidamente os alvos farmacológicos (Dominguez, 2016; Shalem, 2015). Ela também permite o silenciamento permanente do gene alvo em uma linhagem celular estável, criando um subtipo da linhagem já com a modificação desejada (Hsu, 2014; Jinek, 2012; Chen, 2016).

No presente trabalho, a tecnologia CRISPR-Cas9 foi empregada com o objetivo de realizar o *knockout* do gene *PIWILI* em uma linhagem celular de câncer gástrico metastático previamente estabelecida, a fim de compreender seu papel no processo de carcinogênese gástrica.

1.4 CÂNCER GÁSTRICO

Câncer é um termo utilizado para nomear um grupo de diferentes doenças que têm em comum o fato de serem consequência do crescimento desordenado de células somáticas que sofreram um acúmulo de mudanças genéticas e epigenéticas. Essas alterações resultam em características celulares anormais, como capacidade de crescimento desordenado e de invadir o tecido sadio circundante, podendo ainda espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase) (Knudson *et al.*, 1985; Sadikovic *et al.* 2008; Patel *et al.* 2015).

O câncer pode ser resultante da interação entre fatores extrínsecos (como o tabaco, agentes infecciosos, produtos químicos ou radiações) e intrínsecos (mutações herdadas, hormônios, condições imunológicas e mutações aleatórias), que podem agir tanto em conjunto como em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese (American Cancer Society, 2015).

Foram descritas dez alterações (*Hallmarks*), essenciais na fisiologia celular, responsáveis pelo crescimento desordenado e pelo desenvolvimento do microambiente tumoral, que compreendem: 1) manutenção da sinalização proliferativa, 2) insensibilidade a sinais antiproliferativos, 3) resistência à apoptose, 4) capacidade replicativa ilimitada, 5) angiogênese, 6) invasão e metástase, 7) habilidade de evasão do sistema imune, 8) reprogramação do metabolismo, 9) instabilidade genômica e 10) inflamação promovida pelo tumor (Figura 6; Hanahan & Weinberg, 2011).



Figura 6: Os 10 *hallmarks* do câncer. (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011)

O rastreamento do câncer, através do monitoramento do número de novos casos e de mortes, é uma das medidas de avaliação do controle da doença. As últimas estimativas mostraram um aumento mundial no número de casos e mortes por câncer. Em 2008, a incidência e a mortalidade do câncer foram estimadas em 12,4 milhões e 7,6 milhões, respectivamente (WHO, 2019a), enquanto que em 2018, estimou-se cerca de 18 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer no mundo (WHO, 2019b).

Dentre os diferentes tipos de câncer, o câncer gástrico (CG), CID-1º C16, teve a estimativa da ocorrência de cerca de 1,03 milhões de casos novos (5,7% do total) e 781.631 (8,2%) de mortes para o ano de 2018, configurando-se como o sexto tipo mais comum e a quinta maior causa de mortalidade por câncer no mundo (WHO, 2019b).

No Brasil a incidência ocorre em sua maioria em homens, por volta dos 70 anos. Cerca de 65% dos pacientes diagnosticados com câncer de estômago têm mais de 50 anos (INCA, 2018). Esses tumores aparecem em quarto lugar na incidência entre homens, com 13.540 casos novos (6,3%), e em sexto entre as mulheres, com 7.750 casos novos (3,8%) no ano de 2018 (INCA, 2018). No estado do Pará, a incidência de CG apresenta-se ainda mais elevada, ocupando a segunda maior entre os homens e a quarta entre as mulheres. Para o ano de 2018, estimou-se 740 novos casos no estado e 260 na capital, Belém (INCA, 2018).

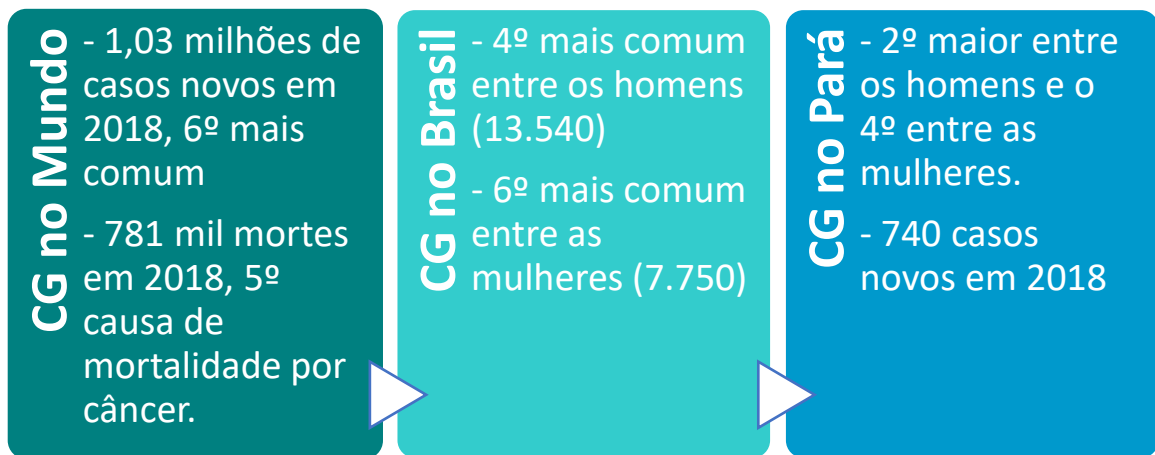


Figura 7: Esquema ilustrando quantitativamente os casos de câncer gástrico (Acervo próprio, 2019)

A previsão mundial para 2025 indica haver probabilidade de decréscimos anuais para a incidência de câncer de estômago, assim como para a mortalidade, como já vem sendo observado nas últimas décadas. A queda na taxa de incidência se deve provavelmente à melhora na conservação dos alimentos em refrigeração, e decréscimo do sal como forma de conservação; acesso da população a saneamento básico, melhoria do padrão alimentar, com ingestão mais frequente de legumes, frutas e verduras frescas e restrição de sal, além do declínio do uso de tabaco (INCA, 2018; Jemal *et al.*, 2011).

Apesar dessa queda na incidência dessa doença ao longo das últimas décadas, o CG ainda se mantém como a quinta malignidade mais comum (WHO, 2019c), provavelmente devido ao fato de ser frequentemente assintomático ou com sintomas inespecíficos nos seus estágios iniciais, sendo essa uma das maiores razões do diagnóstico tardio e consequentemente mal prognóstico (Wadhwa *et al.*, 2013).

O CG é uma doença altamente incidente em grupos de indivíduos de baixa renda e é frequentemente associado ao baixo nível socioeconômico através de dados educacionais e de renda familiar (Arregi *et al.*, 2009), se tornando um grave problema de saúde pública devido ao seu número elevado de casos (Piazuelo *et al.*, 2013).

A dieta é um fator extrínseco de grande influência na carcinogênese gástrica, destacando o uso excessivo de sal, de comidas contendo o composto N-nitroso e a baixa ingestão de ferro (Cover, 2013), além do tabagismo e da infecção pela bactéria *Helicobacter*

pylori, considerada o principal fator de risco etiológico para o desenvolvimento de câncer gástrico (Azarhoush *et al.*, 2008; MARTEL *et al.*, 2009; Martel *et al.*, 2013).

Atualmente, a ressecção do tumor primário com linfadenectomia ainda é o principal tratamento cirúrgico para o câncer gástrico; no entanto, a maioria dos casos de câncer gástrico é diagnosticada no estágio avançado, já que os sintomas da doença em estágio inicial são muitas vezes incipientes. (Dikken *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2013; Marano, 2016). Em países da Europa e nos Estados Unidos, mais de dois terços dos casos de câncer gástrico são geralmente diagnosticados em estágios avançados com uma doença ressecável localmente avançada, não sendo recomendado a ressecção como rotina devido a custo de ineficácia. Como resultado, nesses países se observa uma taxa de sobrevivência de 5 anos de apenas cerca de 25% (Karimi, 2014; Kunz, 2012).

A gravidade dessa doença e o fato de alguns pacientes desenvolverem recidiva da doença logo após a cirurgia apresentando metástase à distância (principal causa de morte entre os pacientes com GC) (Schwarz, 2015), mostram a necessidade da exploração dos mecanismos moleculares por trás da carcinogênese e metástase gástrica. É necessário modificar o cenário atual, através da redução da taxa de mortalidade, bem como contribuindo para a melhora do prognóstico do paciente e para isso se faz necessário da elucidação de mecanismos e genes envolvidos.

1.4.1 GENE PIWIL1 E O CÂNCER GÁSTRICO

Wang *et al.* (2012) mostraram que a expressão de *PIWIL1* no tecido do câncer gástrico foi significativamente maior do que no tecido adjacente ao tumor. Eles também demonstraram que pacientes com uma menor expressão de *PIWIL1* apresentaram uma taxa de sobrevida global significativamente maior em comparação com pacientes com níveis de expressão mais altos. Além disso, a taxa de sobrevida em 5 anos de pacientes com maior nível de expressão de *PIWIL1* foi significativamente menor (36,5% vs 67,6%).

Liu *et al.* (2006) relataram que a expressão de *HIWI* aumenta progressivamente durante o desenvolvimento do câncer. A taxa de expressão em tecidos gástricos normais, gastrite atrófica, metaplasia intestinal e câncer gástrico variou de 10% para 76%. Para investigar ainda mais as funções potenciais do gene *HIWI*, Liu *et al.* (2006) também silenciaram o gene por RNA de interferência e observaram que a supressão desse gene inibiu o crescimento de células de câncer gástrico e induziu parada em G2/M.

Gao *et al.* (2018) observaram que o padrão de expressão do *PIWILI* teve correlações com o grau de diferenciação do tumor, profundidade de invasão, estado linfonodal e estágio TNM. Embora informações relevantes sobre o possível papel de *PIWILI* na carcinogênese do câncer gástrico sejam fornecidas pela literatura atual, os mecanismos moleculares exatos envolvidos nesse processo carcinogênico permanecem obscuros.

1.5 TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL

Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM) é o processo pelo qual uma célula epitelial, passa por alterações bioquímicas que a permitem assumir um fenótipo celular mesenquimal (Kalluri & Neilson, 2003). Além de ser um processo fisiológico essencial para o desenvolvimento e cicatrização de feridas também contribui patologicamente para a fibrose e progressão do câncer (Lamouille, 2014).

A TEM se inicia pela dissociação das junções célula-célula e perda da polaridade apical-basal das células epiteliais. Tais células reorganizam seu citoesqueleto, sofrem mudanças nos seus programas de sinalização e expressão gênica permitindo-as estabelecer características necessárias para a migração e aumento da motilidade, características essas que permitem o desenvolvimento de um fenótipo invasivo com maior capacidade migratória, elevada resistência à apoptose e aumento da produção de componentes da matriz extra celular (Thiery & Sleeman, 2006; Thiery, 2009).

Uma característica marcante da TEM é a mudança de expressão da E-caderina, glicoproteína membranar que desempenha um papel crucial na adesão célula-célula, levando à desestabilização das junções de adesão (Huang, 2012), assim como de seus fatores de transcrição como *Snail*, *Snug* e *Twist*. Essas mudanças na expressão gênica impedem a formação de novas junções célula-célula, resultando na perda da função de barreira epitelial (Peinado, 2007). O desfecho do processo de TEM é a degradação da membrana basal subjacente e a formação de uma célula mesenquimal que pode migrar da camada epitelial em que se originou para os tecidos subjacentes, fazendo desse mecanismo de grande interesse devido ao seu importante papel no câncer (Yanjia e Xinchun, 2007).

1.6 LINHAGENS CELULARES

O estabelecimento e caracterização de linhagens celulares de câncer gástrico tem sido usado para obter informações sobre a evolução da malignidade, uma vez que estas podem refletir a diversidade de fenótipos tumorais, fornecendo modelos biológicos úteis para o estudo de neoplasias (Ribeiro *et al.*, 2010). Vale ressaltar que a maioria das linhagens gástricas foram estabelecidas em países Asiáticos, por apresentar alta prevalência da doença; em contrapartida, em países ocidentais existem poucas linhagens gástricas disponíveis para modelos de estudos (Lima *et al.*, 2004).

A linhagem utilizada nesse trabalho foi estabelecida e caracterizada pelo nosso grupo de pesquisa, a linhagem AGP01 (Ascite Gástrica Paraense 01), oriunda de fluido ascítico de um paciente do Estado do Pará, sendo obtida de amostras de ascite carcinomatosa de adenocarcinoma gástrico (Leal *et al.*, 2009). O tumor, do tipo intestinal, ocupava as regiões do corpo e do antro e possuía estadiamento T3N2M1 (Classificação detalhada nas Tabelas Suplementares 2 e 3).

A cultura celular da linhagem AGP01, já caracterizada citogeneticamente, possui crescimento desorganizado, com aglomerações e divisões heterogêneas (bipolar e multipolar), que contribuem para instabilidade cromossômica (LEAL *et al.*, 2009). A linhagem celular AGP01 foi eleita para o desenvolvimento do presente trabalho por proporcionar um excelente modelo para o estudo do câncer gástrico, visto que explora o subtipo histológico intestinal e a presença de metástase.

2. APLICABILIDADE CLÍNICA

A CRISPR-Cas9 é uma tecnologia que permite manipular com precisão praticamente qualquer sequência genômica especificada por um pequeno trecho de RNA guia (Chen, 2016; Kawahara, 2016; Maeder, 2016; Travis, 2015; Charpentier, 2013), permitindo a elucidação da função do gene envolvido no desenvolvimento e progressão da doença, correção de mutações causadoras de doença, e inativação de oncogenes ativados ou ativação de genes supressores de tumor desativados (Charpentier, 2014; Doudna, 2014; Hsu, 2014; Wang, 2016).

O domínio desta tecnologia possibilita elucidar como as células cancerosas estão conectadas e como funcionam as redes reguladoras formadas por genes mutados anormais, que muitas vezes, são mais importantes do que o gene alvo em si, permitindo encontrar novos alvos para a terapias, entender os mecanismos de resistência aos medicamentos e ajudar no desenvolvimento de tratamentos de segunda linha mais específicos, potencializando a medicina personalizada e direcionada.

O estabelecimento da linhagem AGP01 com *knockout* do gene *PIWLI* possibilita dissecar mecanismos de tumorigênese e compreender mecanismos moleculares que sublinham o processo proliferativo, permitindo o estudo de modelos experimentais em que as vias celulares alteradas podem indicar terapias alvo reproduzidas e novas podem ser implementadas contribuindo para o desenvolvimento, progressão, caracterização e modelagem de novas estratégias terapêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

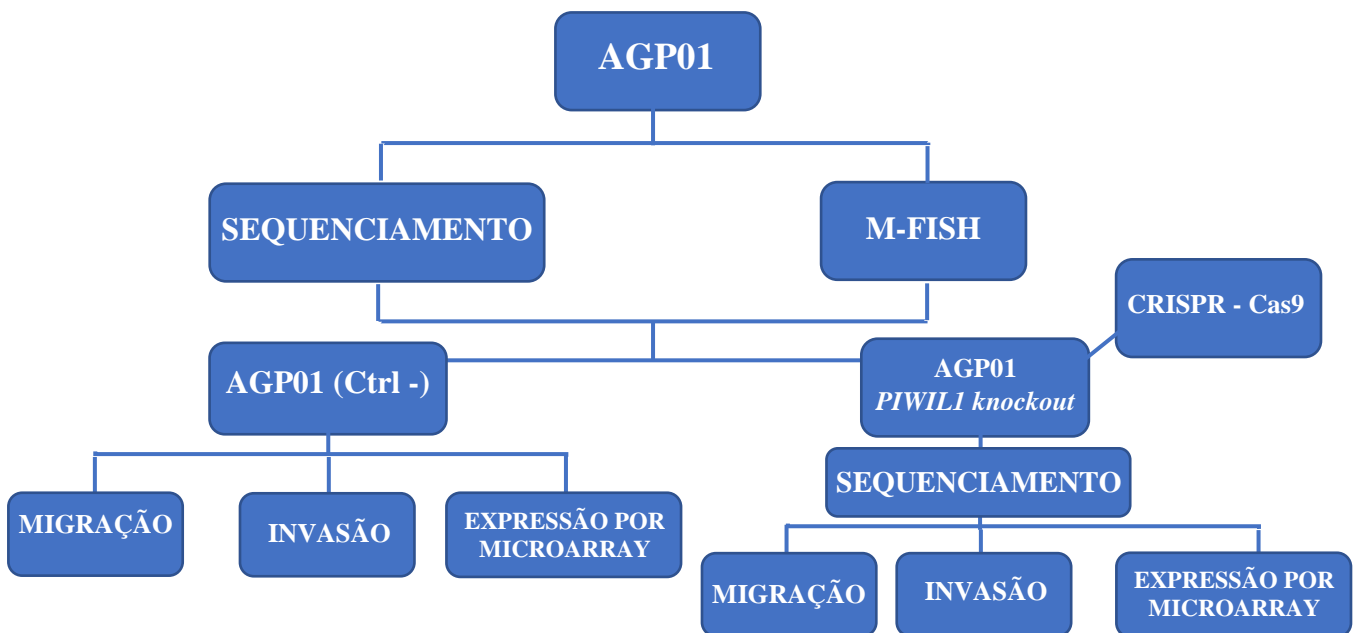
Investigar mecanismos pelos quais a proteína PIWIL1 confere vantagens às células de câncer gástrico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização cariotípica e avaliação de viabilidade do modelo celular AGP01
- Estabelecer *knockout* do gene *PIWIL1* na linhagem de câncer gástrico AGP01
- Comparar as capacidades de migração das linhagens AGP01 e AGP01/*PIWIL1 knockout*
- Comparar as capacidades de invasão das linhagens AGP01 e AGP01/*PIWIL1 knockout*
- Comparar a expressão de mRNA das linhagens AGP01 e AGP01/*PIWIL1 knockout*

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos realizados nesse trabalho foram realizados de acordo com o fluxograma abaixo:



4.1 CULTIVO CELULAR

A linhagem celular de adenocarcinoma gástrico humano AGP01 foi cultivada em garrafas de cultura apropriadas contendo DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*), suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) e com 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina. As garrafas com as células foram mantidas em estufa com atmosfera controlada de 5% de CO₂ à 37°, tendo sua confluência avaliada em microscópio invertido e meio trocado sempre que os nutrientes foram consumidos.

A linhagem celular foi testada e autenticada por citogenética convencional (Leal, 2009) e, recentemente, foi testada por hibridização in situ com fluorescência multicolor (FISH), tais resultados são apresentados neste trabalho.

4.2 M-FISH

O 24-color-FISH, utilizado simultaneamente como modelo de produção cromossômica total (WCP), foi feito como relatado previamente (Liehr, 2002; Liehr, 2017). Um total de 20 metáfases foi analisado, utilizando um microscópio de fluorescência (Axio Imager Z1 mot; Carl Zeiss AG), conduzido com o auxílio de um sistema de filtragem para a discriminação entre os cinco fluorocromos e o contra-contraste DAPI; sendo o último utilizado para induzir um padrão de bandas semelhante ao bandejamento GTG (*G-bands by Trypsin using Giemsa*). A captura e execução das imagens foram realizadas utilizando o sistema de imagem do ISIS (MetaSystems).

A técnica de citogenética molecular M-FISH se baseia na pintura de cada um dos cromossomos humanos simultaneamente usando sondas de pintura cromossômica de colorações diferentes para cromossomos inteiros. 5 fluorocromos (*Spectrum green, Spectrum Orange, Texas Red, Cy5 e DEAC*) diferentes foram utilizados para combinar as 24 cores específicas necessárias para a pintura de todos os cromossomos, excluindo-se a contra-coloração por DAPI, de acordo com a Figura 8.

chromosome	Spectrum Green	Spectrum Orange	Texas Red	Cyanine 5*	DEAC**
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
X					
Y					

Figura 8: Esquema demonstrando a coloração cromossômica no M-FISH

As imagens são adquiridas por meio de uma câmera CCD (*charge-coupled device*) ligada a um computador com análise de imagens e com um software específico para análise dessas imagens. Essa análise por computador é necessária, pois pelo menos um dos fluorocromos utilizados é invisível ao olho humano. É utilizado um conjunto específico com 6 filtros, de acordo com os fluorocromos que foram utilizados para a pintura das sondas.

O M-FISH é utilizado, em genética clínica, para confirmação, refinamento e/ou caracterização de translocações, para a procura por rearranjos críticos e para a caracterização de cromossomos marcadores. Em citogenética do câncer, cariótipos e cromossomos marcadores de leucemias, linfomas, tumores sólidos e linhagens celulares podem ser estudados; além de também poder ser utilizado para análises interfásicas. A sonda utilizada foi fabricada e obtida no/do Laboratório de Citogenética Molecular, do Instituto de Genética Humana, Jena, Alemanha e executada de acordo com seu protocolo.

Um esquema ilustrativo sobre a técnica é demonstrado na Figura 9. Resumidamente, o DNA alvo (cinza claro) é fixado na superfície de uma lâmina e desnaturado. Em paralelo, a sonda de DNA (preta) tem que ser marcada com um fluorocromo ou/e um hapteno não-fluorescente, desnaturado e pré-hibridizado com DNA repetitivo não marcado (cinza escuro). Então a sonda de DNA é colocada junto com o DNA alvo e hibridizada. Procedimentos de pós-lavagem removem fitas simples de DNA não marcadas, bem como ligações de DNA inespecíficas. Quando um hapteno não-fluorescente é utilizado, ele tem que ser detectado por um anti-hapteno fluorescente. Após a detecção, lavagens e aplicação de solução *antifade* com DAPI, o M-FISH é finalizado e a lâmina está pronta para ser analisada ao microscópio.

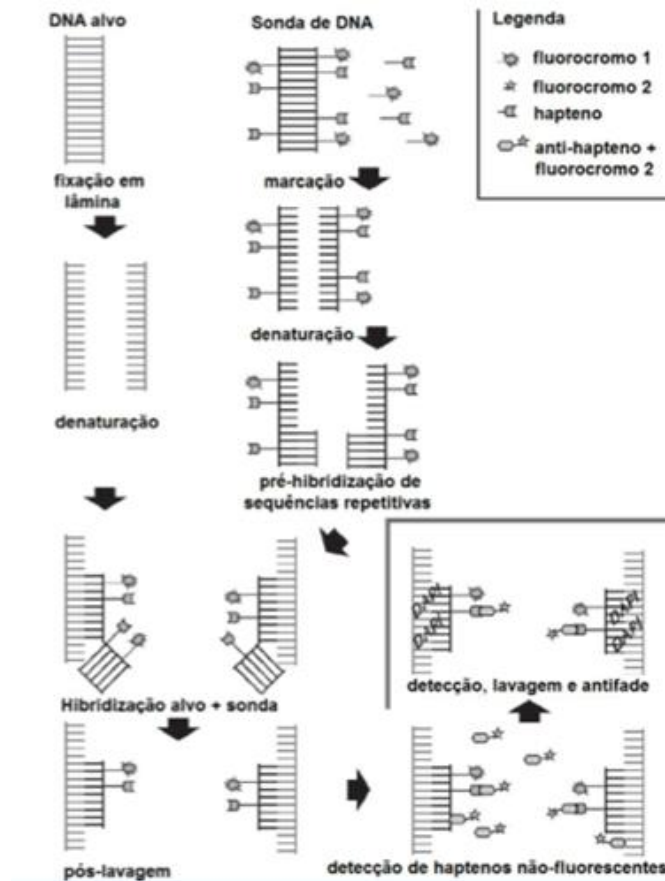


Figura 9: Esquema explicativo da técnica de M-FISH.

4.3 KNOCKOUT DE *PIWILI* UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR-CAS9

Foi semeada em uma placa de 96 poços uma concentração de 1×10^4 de células AGP01 por poço em meio DMEM-F12 sem antibiótico e sem antifúngico e mantida em estufa durante 24h para adesão. Subsequentemente, a transfecção foi realizada com meio sem antibiótico e sem antifúngico utilizando CR-0046-03-005 (sistema CRISPR-Cas9, Dharmacon GE Life Sciences) durante 48h. Para o procedimento de transfecção primeiramente foi preparada uma solução contendo 1 μ l de RNAs CRISPR (crRNAs) misturada com o pequeno RNA transativador (tracrRNA) 2 μ l de Cas9 e 7 μ l de meio sem soro, sem antibiótico e sem antifúngico (para cada poço). Em outro tubo, foram adicionados 0,4 μ L de DharmafecDUO e 9,6 μ L de meio DMEM-F12 sem soro, sem antibiótico e sem antifúngico (para cada poço).

As soluções foram então incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente antes de serem combinadas. Após a combinação, a solução foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente e por fim foram adicionados 80 μ L de meio DMEM-F12 /10% de SBF sem antibiótico e sem antifúngico por poço. Ao final da transfecção, todo o conteúdo (de cada

poço) foi transferido para uma placa de 24 poços contendo meio DMEM-F12/SBF a 10% e penicilina-streptomicina a 1%.

Após 24h, as amostras foram tratadas com 6 µg/mL de puromicina por 72 h para selecionar os clones resistentes. Em seguida, foram plaqueadas 40 células por poço em uma placa de 6 poços para isolar os clones pelo método do papel de filtro. Este método consiste em utilizar um pedaço de papel filtro cortado e autoclavado para que, após ser embebido em tripsina, possa ser posicionado acima de uma única colônia de células que tenha crescido de uma célula isolada, permitindo a coleta desse clone. Posteriormente, cada clone cresceu em um poço separado em uma placa de 6 poços, para que pudesse atingir a confluência necessária para realizar a extração e sequenciamento do DNA.

4.4 SEQUENCIAMENTO

O DNA das células da linhagem AGP01 foi extraído utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation) de acordo com as instruções do fabricante. Para a análise do segmento de interesse, foi empregada a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction*) que utilizou iniciadores (*primers*) específicos, construídos com o auxílio do programa *online Primer3*, que visam a região de ligação do RNA (**Tabela 2** *Sistemas de primers, com suas sequências forward (F) e reverse (R), os tamanhos dos amplicons* Tabela 2). Para o desenho dos *primers* do gene foram utilizados *contigs* específicos do genoma referência para a espécie *Homo sapiens*, descritas no banco de dados NCBI. Os *primers* para o estudo do gene foram desenhados visando a região de ligação dos crRNAs comprados.

Tabela 2 Sistemas de primers, com suas sequências forward (F) e reverse (R), os tamanhos dos amplicons

Região	Iniciador	Temp.(°C)	Amplicon
Éxon 15	F- TGATTAGCTGTGTGGCTGAAA	59 °C	571 pb
	R- CAATGAAGGGATGACCCG		

As quantidades dos reagentes utilizados na PCR para um volume final de 12 µL foram as seguintes: 6,25 µL de H₂O sem nuclease, 0,5 µL de *primer forward* (10 ng / µL), 0,5 µL de *primer reverse* (ng/µL) , 4,25 µL de *GoTaq Colorless Master Mix 2X* (*Promega Corporation*) e 1 µL de DNA (10 ng / µL). As condições foram de 1 ciclo a 95 ° C por 3 min para desnaturação inicial seguido por 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94 ° C por 2 min, anelamento de primer a 59 ° C para 1 min e extensão a 70 ° C por 2 min, terminando com 1 ciclo a 70 ° C para uma extensão final por 30 min. Após a PCR, os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose 1,5% e submetidos à eletroforese (100V), permitindo a visualização das bandas do material genético.

Na etapa seguinte, de sequenciamento direto do produto do PCR, as quantidades dos reagentes utilizados para um volume final de 20 µL foram as seguintes: 15 µL de água sem nuclease, 0,5 µL de iniciador ou reverso (10 ng/µL), 0,5 µL de Big Dye, 3 µL de *Save Money* e 1 µL da reação de PCR. Para essa reação, foi utilizado o kit *ABI PRISM Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*).

A reação de sequenciamento foi realizada com as seguintes condições de termociclagem de 25 ciclos: desnaturação a 96 ° C por 50 s, anelamento de primer a 59 ° C por 1 min e extensão a 60 ° C por 4 min, terminando com 1 ciclo a 4 ° C por 5 min. Após este procedimento, foi realizado um passo de precipitação para purificar o produto da reação antes de dar continuidade à análise. Para esta etapa, as amostras foram lavadas com isopropanol a 70% e etanol a 70%. Posteriormente, foi realizada a leitura do sequenciamento utilizando o sequenciador automático *ABI Prism 3500* (*Applied Biosystems*).

A metodologia utilizada foi baseada na síntese bioquímica da cadeia de DNA, pelo método de Sanger, tendo sido utilizado o polímero POP7 (*Applied Biosystem*). As sequências nucleotídicas produzidas foram diretamente editadas no programa *Sequencing analysis* versão 5.2 (*Applied Biosystem*) em computador *Dell*, acoplado ao sequenciador *ABI prism 3130 DNA Sequencer*.

4.4.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO

A sequência de referência para o exon 15 no gene *PIWIL1* foi obtida a partir do banco de dados encontrado no site do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*) e comparada com a sequência de DNA da linhagem celular modificada, bem como com o controle negativo (linhagem celular sem o

knockout do gene PIWIL1). Para inferir o efeito de mudanças na síntese de proteínas, aplicamos o *Gene Runner* v. 3.01 (*Hastings software Inc.*; <http://www.generunner.com>).

4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO (*SCRATCH* ou *WOUDEN HEALING ASSAY*)

As células foram cultivadas em placas de 12 poços numa densidade de 2×10^5 células/poço da linhagem AGP01 original e da linhagem AGP01 com nocaute e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para a aderência. Após esse período foi feito o “arranhão” com uma ponteira de 10 µL no centro de cada poço (após o arranhão, o meio foi retirado para eliminar as células soltas, foi feita uma lavagem com PBS 1x e foi acrescentado DMEM com Soro Bovino Fetal).

O comportamento das células foi observado e fotografado no mesmo local no tempo 0 (logo após fazer o risco) e nos tempos 6h, 12h e 24h. O tempo de 24 horas foi embasado no tempo de duplicação dessas células, uma vez que a migração deve ser avaliada antes das células sofrerem duplicação, demonstrando que o deslocamento ocorreu devido à migração das células que foram inicialmente plaqueadas e não devido à proliferação celular. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e baseados na metodologia Vicente-Manzanares e Horwitz, 2011.

4.5.1 ANÁLISE DOS DADOS

As áreas dos arranhões após o tratamento nos diferentes tempos foram quantificadas no programa *Image J*. Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão de três experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre o controle e o tratamento nos diferentes tempos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni ($\alpha=0,05$).

4.6 ENSAIO DE INVASÃO (*BOYDEN CHAMBER ASSAY*)

Para o ensaio de invasão, foram utilizados insertos de *Boyden* com câmara superior contendo membrana de policarbonato com inserções de filtro (poros 8 µm, *BD Biosciences*) onde foi adicionado matrigel (Sigma-Aldrich) e deixado para polimerização *overnight*. Foram semeadas na câmara superior células na concentração de 2×10^5 /poço em 1 mL de DMEM (*Thermo Fisher Scientific*TM) sem Soro Bovino Fetal. Na câmara inferior foi adicionado

DMEM com 10% de Soro Bovino Fetal, que funciona como quimioatraente para as células presentes na câmara superior.

4.6.1 ANÁLISE DOS DADOS

As células remanescentes acima da membrana de inserção foram removidas por raspagem com um cotonete estéril. As células na parte inferior do filtro foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com corante Giemsa. As células foram então fotografadas e analisadas utilizando um microscópio de luz e contadas em campos ópticos. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e analisados através de Teste t.

4.7 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração de RNA total foi realizada utilizando o kit de sistema de isolamento de RNA total da Promega, de acordo com as especificações do fabricante. Ambas as linhagens, AGP01 e AGP01 *PIWILI knockout* foram preparadas para extração de mRNA. As amostras foram lisadas com tampão de lise contendo beta-mercaptoetanol e depois diluídas em tampão de diluição de RNA. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos na velocidade máxima. Em seguida, adicionou-se etanol a 95% para assegurar condições adequadas de ligação à membrana.

As amostras foram então transferidas para colunas centrífugas onde o RNA poderia se ligar à membrana da coluna, facilitando a lavagem para eliminar possíveis contaminantes, bem como favorecendo a extração de alta qualidade do RNA total.

No final do procedimento, o RNA foi diluído em 60 µl de água livre de nuclease. O RNA total foi quantificado usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 UV-VIS versão 3.2.1 (*Nanodrop Technologies*). A qualidade do RNA também foi avaliada pela análise da relação A260/A280 de acordo com as especificações do fabricante. O RNA purificado foi armazenado a -80°C para o ensaio de expressão por *microarray*.

4.8 ENSAIO DE EXPRESSÃO POR MICROARRAY

Para o ensaio de *microarray*, utilizou-se um kit de análise de expressão gênica baseado em *microarray* de uma cor (*Agilent Technologies*) de acordo com o protocolo fornecido pelo

fabricante. O perfil de expressão gênica foi avaliado em ambas as linhagens celulares (AGP01 com e sem *knockout* do *PIWIL1*).

O RNA total obtido durante a fase de extração foi utilizado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa usando a RNA polimerase T7. A síntese da segunda cadeia de cDNA foi utilizada como molde para a reação de transcrição *in vitro* para a produção de cRNA. O cRNA foi então incorporado ao fluorocromo 3-cianina (Cy-3) usando o kit *Low Input Quick Amp Labeling (Agilent Technologies)* de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Posteriormente, o processo de purificação do cRNA foi realizado.

O cRNA foi quantificado por um espectrofotômetro (pmol/L), através do qual foi possível analisar a razão de absorvância (260 nm/280 nm) e a concentração de cRNA (ng/ μ L) em cada amostra. Após este procedimento a hibridização foi realizada por 17 h em uma câmara de hibridização a 65 ° C a 10 rpm. Após esse período, a lâmina foi lavada e imediatamente digitalizada no sistema *Agilent G4900DA SureScan Microarray*.

A configuração a seguir foi usada para digitalizar os slides de *microarray* para uma cor: região de varredura de 61 mm \times 21,6 mm, resolução de varredura de 5 μ m, canal de corante verde. Em seguida, as imagens foram obtidas por meio do software *Feature Extraction v10.10*, e os dados foram analisados com os programas *GeneSpring GX 9.0* e *IPathwayguide (Advaita Bioinformatics Company, Plymouth, MI, Estados Unidos)*. A identificação genética seguiu um critério de restrição com um *fold change* > 2.

4.9 EXPRESSÃO DIFERENCIAL E ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS

Para identificar mRNAs Diferencialmente Expressos (DE), comparamos os perfis de expressão das sondas antes e após o *knockout* do *PIWIL1*. Sondas com uma média de *fold-change* < 0,5 e uma média de *fold-change* > 2 [$\text{Log}_2(\text{fold-change}) > 1$] foram selecionados para análise diferencial. O teste *t* de Student foi realizado em 1222 sondas selecionadas, o ajuste por taxa de falsa de descoberta (FDR; Benjamini, 1995) foi realizado e os genes com um valor de *p* ajustado <0,05 foram marcados como DE.

Para o *Volcano Plot*, o *fold change* e o valor *P* de todas as sondas foram usados, e as sondas foram marcadas como DE seguindo os critérios anteriores. O enriquecimento de vias do *Gene Ontology* (GO) foi realizado usando as bibliotecas *org.Hs.eg.db* (Carlson, 2017) e *Gostats* (Falcon, 2007). Todas as análises gráficas e estatísticas foram realizadas na plataforma R (*R Core Team*, 2017, Viena, Áustria; [https:// http://www.r-project.org/](https://http://www.r-project.org/)).

5 RESULTADOS

Os resultados apresentados abaixo estão descritos no artigo, já publicado, “*Piwi like RNA-mediated gene silencing 1 gene as a possible major player in gastric cancer.*” (DOI: 10.3748/wjg.v24.i47.5338), que consta na sessão de anexos no fim deste trabalho.

5.1 FISH DE 24 CORES USANDO SONDAS WCP HUMANAS

O FISH de 24 cores usando todas as sondas WCP humanas revelou na linhagem celular AGP01 um cariótipo bastante complexo, como segue (Figura 10):

63,XX,inv(1)(p12q43), der(1)(1pter->1p12::1q43->1p12::9p12->9pter), +der(1)t(1;12)(q21;q12), +del(1)(p12),+del(2)(p12), +der(2)t(2;8)(p12;q11.2), inv(3)(p21q13)x2, +inv(3)(p21q13), +der(3)t(3;5)(p14;q13), t(4;14)(p12;q11.2), dic(4;12)(p15;q12), +der(4)t(2;4)(p ou q?:q12), del(5)(p13)x2, +der(5)x2,del(6)(q12)x2, +del(6)(p21), inv(7)(p12;q11.2), der(7), der(9)t(9;acro)(p21;p12), der(9)t(6;9)(p12;p12), t(13;13)(p10), der(15):(q13->p11::p11->qter),-15, der(16)t(X;16)(q or p?:q23), +der(16)t(12;16)(q12;q23), 21p+,t(22;22)(p10)

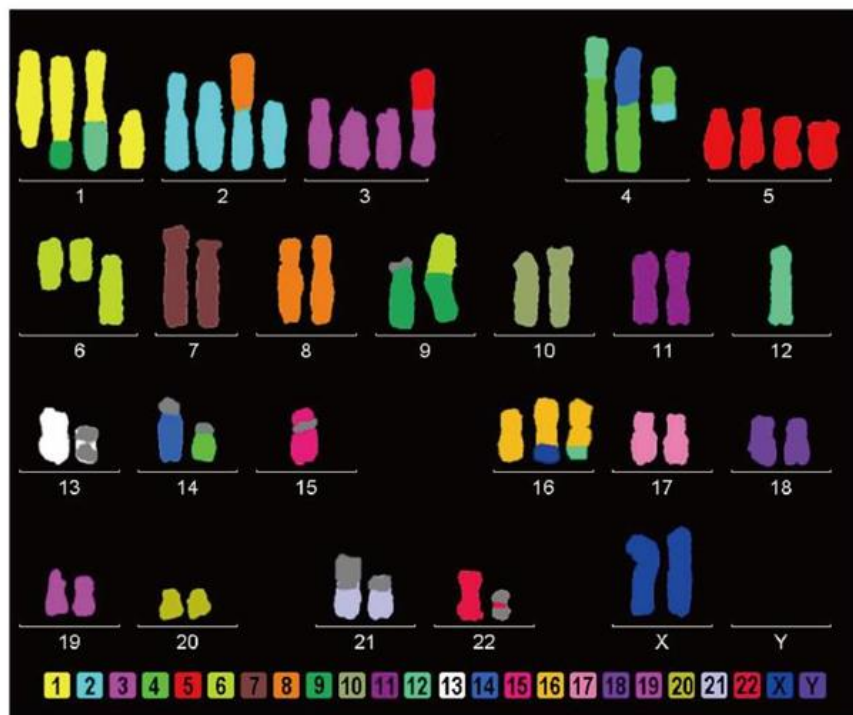


Figura 10: Linhagem celular AGP01 multicolor-FISH mostrando várias alterações cromossômicas, incluindo a monossomia do cromossomo 12, onde está localizado o gene PIWIL1.

A partir da análise, foi verificado que o único cromossomo 12 (onde está localizado o gene *PIWILI*) permanece intacto, sem translocações ou cromossomos derivados (Figura 10).

5.2 KNOCKOUT DO GENE *PIWILI* UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR-CAS9

O knockout do gene *PIWILI* foi bem-sucedido, conforme determinado pelo sequenciamento de Sanger. Este último revelou uma inserção de 7 adeninas na sequência do gene *PIWILI* (Figura 11) que causou uma mutação do tipo *frameshift* (mudança na matriz de leitura) que compromete a síntese proteica.

É importante notar que a monossomia do cromossomo 12 corrobora o resultado do sequenciamento, uma vez que a sequência de inserção de 7 pb foi observada em hemizigose, além de ter mostrado o modelo celular AGP01 como uma excelente escolha, já que o aumento do número de cópias do gene pode estar ligado com a não funcionalidade da tecnologia CRISPR.

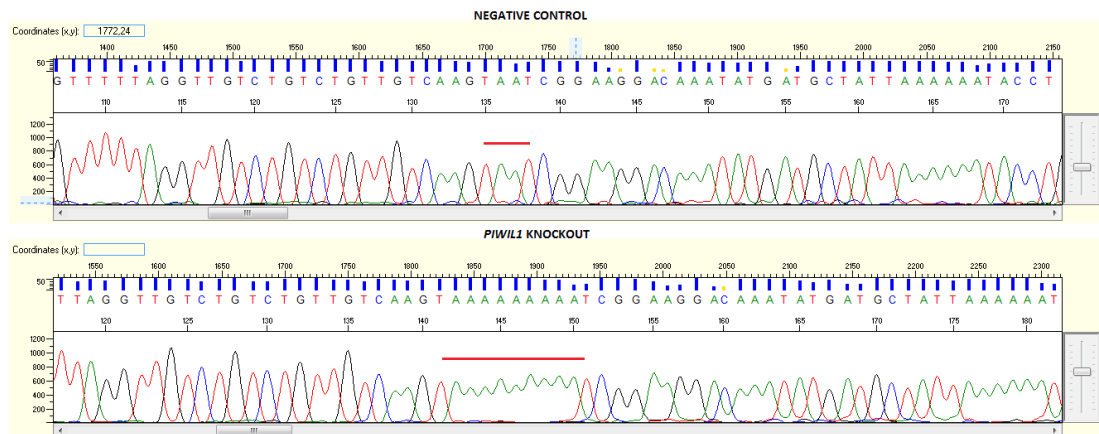


Figura 11: Eletroferogramas comparando sequências da linhagem AGP01 com e sem o uso da tecnologia CRISPR-Cas9. Pode-se observar a inserção de sete adeninas na sequência do gene *PIWILI* após o uso do sistema CRISPR-Cas9 (B) em comparação com a sequência de referência do controle negativo (A).

A análise do efeito de mudanças na síntese da proteína codificada indicou um códon de parada prematuro (Figura 12) sugerindo que essa inserção gera uma proteína truncada consistindo de 573 aminoácidos (o tipo selvagem contém 861) com um fenótipo de perda de função, o que significa que o *knockout* foi eficiente. Notavelmente, a linhagem AGP01/*PIWILI* *knockout* permaneceu viável após o experimento utilizando o sistema CRISPR-Cas9.

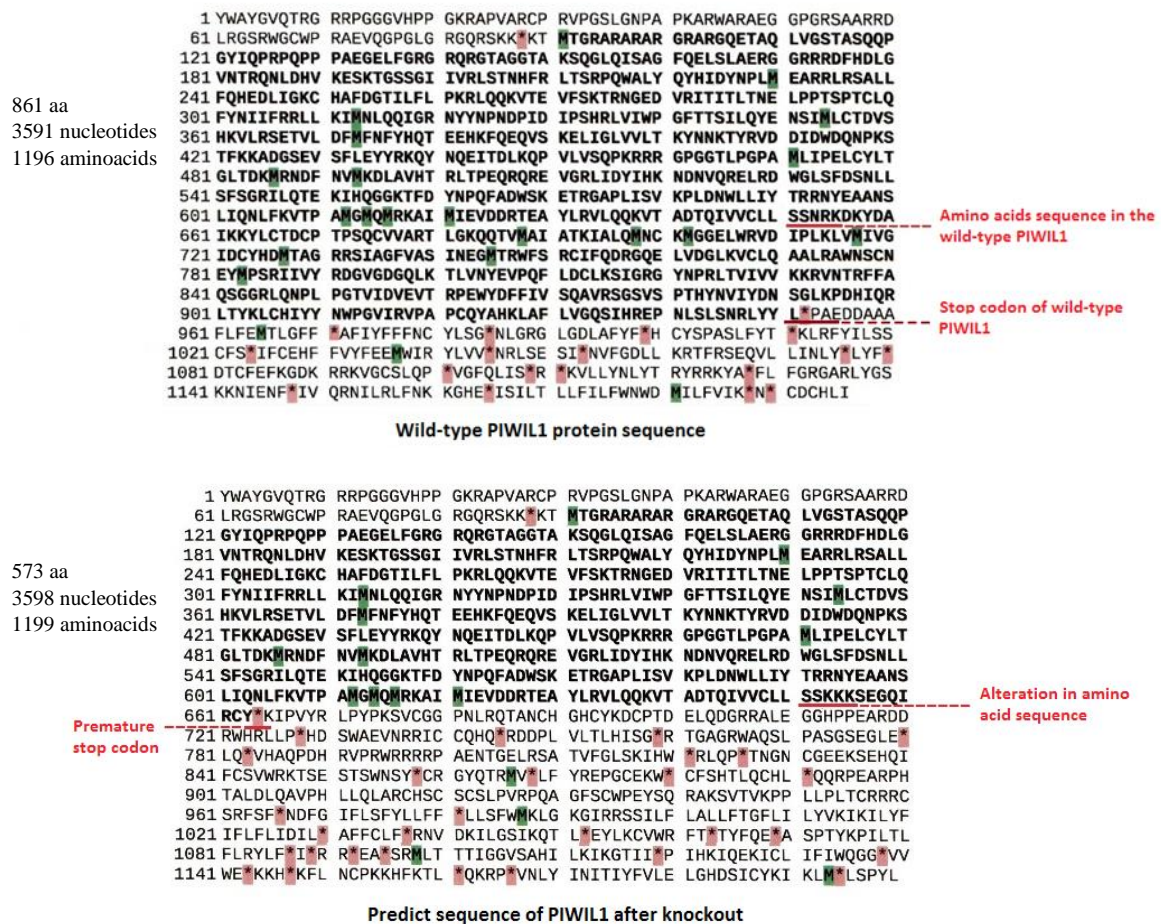


Figura 12: Sequências de aminoácidos da proteína PIWIL1 do tipo selvagem e da proteína PIWIL1 após a inserção de sete adeninas pelo sistema CRISPR-Cas9.

5.3 ENSAIO DE MIGRAÇÃO (*SCRATCH* ou *WOUND-HEALING ASSAY*)

O knockout do gene PIWIL1 causou uma diminuição significativa na capacidade de migração de AGP01 após 24 h ($P < 0,01$; Figura 13), o que é consistente com o fato de que esta proteína está relacionada a várias vias que regulam a motilidade celular.

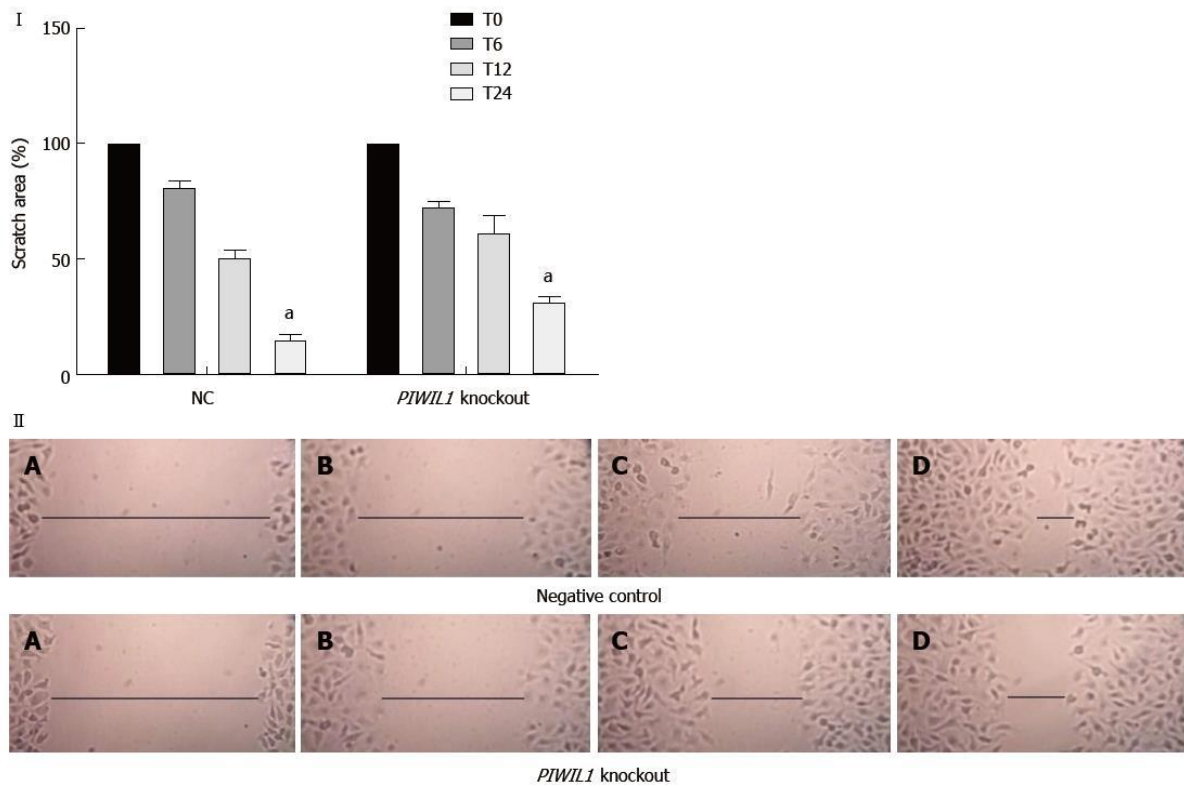


Figura 13: Análise da capacidade de migração da linhagem celular AGP01 com e sem o knockout do gene *PIWIL1*. T0: Imediatamente após a lesão; T6: 6 h após lesão; T12: 12 horas após a lesão; T24: 24 horas após a lesão NC: controle negativo. $P < 0,01$. *Two-way* ANOVA.

5.4 ENSAIO DE INVASÃO (*BOYDEN CHAMBER ASSAY*)

Através do ensaio de invasão, foi possível verificar que o *knockout* do gene *PIWIL1* causou uma diminuição significativa na capacidade de invasão da AGP01 ($P < 0,001$; Figura 14), o que também é consistente com o fato de que esta proteína está relacionada a várias vias que regulam motilidade celular.

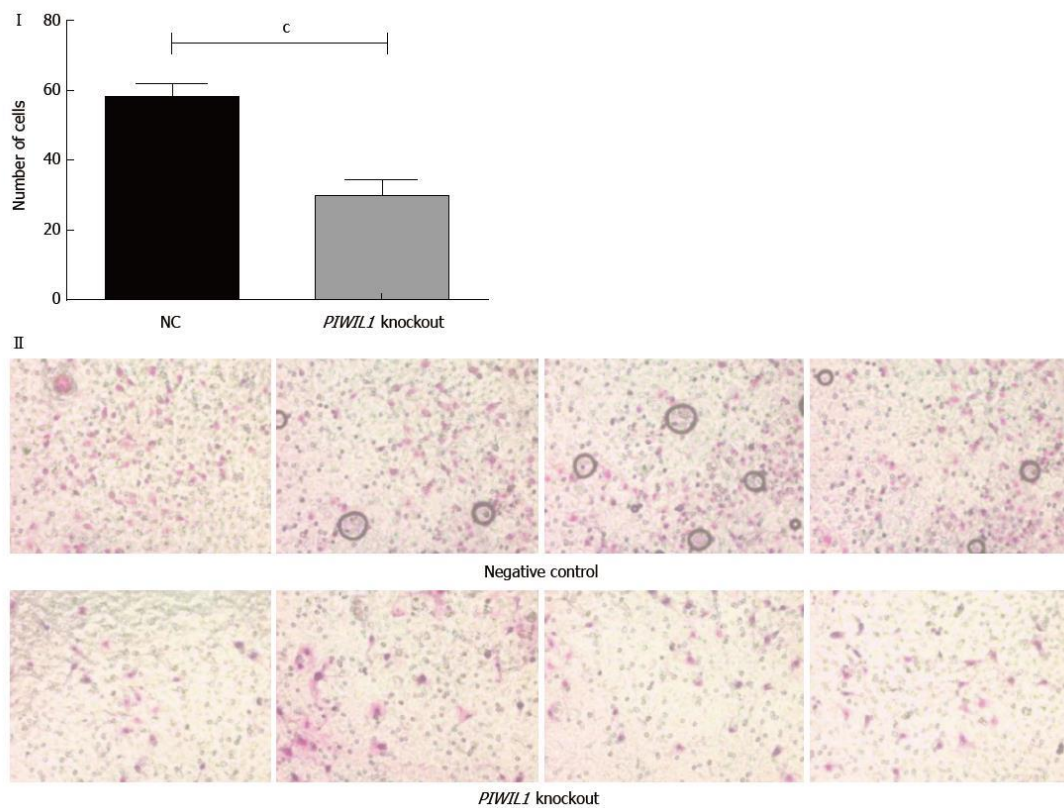


Figura 14: Análise da capacidade de invasão da linhagem AGP01 com e sem o knockout do gene *PIWIL1*. A diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi demonstrada pelo teste t de Student ($P < 0,001$). Fotomicrografia do ensaio de invasão celular demonstra a diminuição do número de células que invadiram quando o *PIWIL1* foi eliminado. NC: controle negativo

5.5 mRNA ARRAY E ENRIQUECIMENTO DE VIAS DO GENE

A análise diferencial permitiu identificar, ao comparar os perfis de expressão antes e após o *knockout* permanente de *PIWIL1* na linhagem celular AGP01, um total de 251 mRNAs diferencialmente expressos (DE) [valor p (FDR) $< 0,05$ e $|\text{Log}_2(\text{Fold-Change})| > 1$]. Um total de 43 sondas de mRNA apresentaram expressão aumentada e 208 apresentaram expressão diminuída (Figura 15). Os genes DE são descritos na Tabela Suplementar 4.

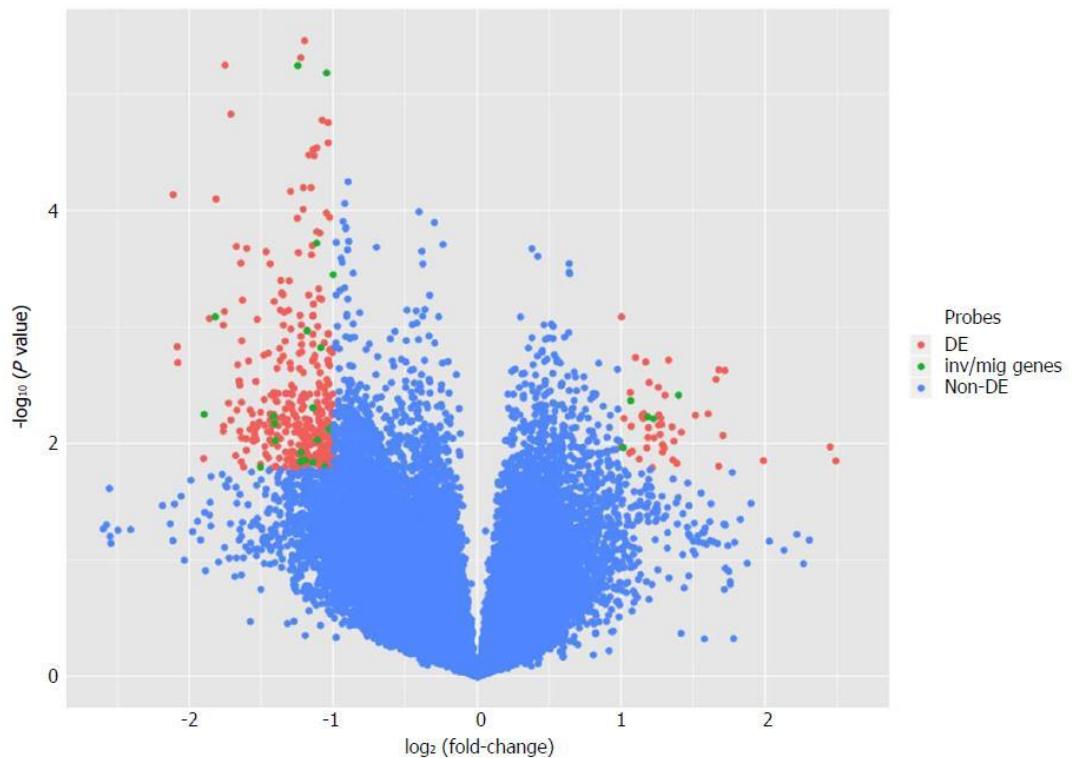


Figura 15: Volcano Plot que compara a expressão gênica após o knockout permanente de PIWIL1 na linhagem celular AGP01 de câncer gástrico. Sondas diferencialmente expressas [valor de P ajustado $<0,05$ e $|\text{Log}_2(\text{Fold-Change})| > 1$] estão nas áreas superior esquerda e direita (vermelho). Os mRNAs envolvidos nos processos de invasão e migração estão em verde.

Adicionalmente, foi realizada uma análise funcional agrupando todos os mRNAs DE. Essa abordagem revelou que um total de 35 genes (cinco hiperexpressos e 30 hipoexpressos) codificavam proteínas envolvidas em processos celulares de invasão e migração (Figura 16; Tabelas Suplementares 4 e 5).

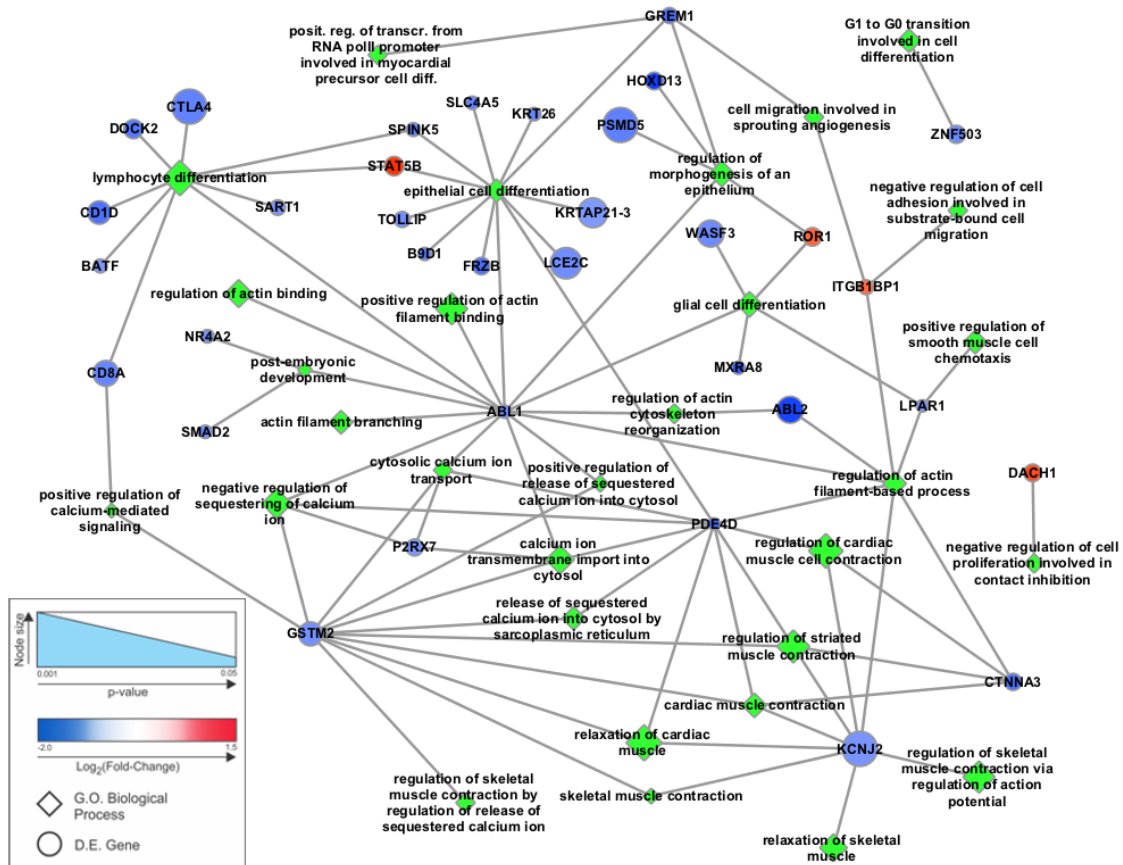


Figura 16: Enriquecimento de vias dos mRNAs DE. Processos envolvidos invasão celular e migração

Tabela 3 Genes diferencialmente expressos envolvidos em processos celulares de invasão e migração ao comparar linhas celulares antes e após o knockout de PIWIL1.

Genes	Regulação
<i>DACH1, ITGB1BP1, RALGPS1, ROR1, STAT5B</i>	Hiper
<i>ABL1, ABL2, B9D1, CD8A, CTNNA3, FRZB, GREM1, GSTM2, HOXD13, DOCK2, SMAD2, WASF3, CTLA4, SART1, BATF, CD1C, NR4A2, MXRA8, KCNJ2, KRT26, KRTAP21-3, LCE2C, LPAR1, P2RX7, PDE4D, PSMD5, SLC4A5, SPINK5, TOLLIP, ZNF503</i>	Hipo

De acordo com a literatura atual, 9 desses 35 genes (*DOCK2, ZNF503, PDE4D, ABL1, ABL2, LPAR1, SMAD2, WASF3* e *DACH1*) possivelmente estão relacionados aos mecanismos utilizados pela PIWIL1 para promover efeitos carcinogênicos relacionados à migração e invasão, uma vez que suas funções são consistentes com as mudanças observadas (estarem hiper ou hipoexpressos após o *knockout*).

6 DISCUSSÃO

Uma das principais características do câncer é a proliferação celular descontrolada. Estudos anteriores apontaram evidências indicando que o gene *PIWIL1*, que desempenha um papel fundamental na autorrenovação das células-tronco, pode afetar a proliferação das células cancerígenas, sendo um oncogene que regula vários mecanismos celulares importantes para o processo carcinogênico (Xie, 2018; Wang, 2017). Vários estudos vêm demonstrando que o gene está intimamente relacionado aos comportamentos biológicos das células tumorais, como proliferação, apoptose, adesão, migração e quimiorresistência (Litwin, 2017; Chen, 2015; Xie, 2016; Sun, 2017; Liang, 2017). As proteínas PIWI regulam a expressão gênica principalmente através da ligação específica com RNAs que interagem com PIWI, os quais estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos (Juliano, 2014; Zeng, 2011). Seus mecanismos regulatórios precisos incluem o silenciamento gênico, o silenciamento de transposons, a inibição da tradução e as mudanças epigenéticas (Gebert, 2015; Sugimoto, 2007).

No presente trabalho fornecemos uma primeira descrição citogenética molecular do cariótipo de AGP01. Como é habitual nas linhagens celulares de câncer, foram observadas ligeiras alterações de célula para célula em número de cromossomos ou rearranjos cromossômicos de células individuais (Bloomfield, 2015), sendo o cariótipo aqui descrito, foi o modal. Curiosamente, inversões, cromossomos dicêntricos e translocações recíprocas de acrocêntricos homólogos (#13, #15, #22) foram observadas. No geral, o ganho das seguintes regiões estava presente: #1, #3, partes grandes de #2 e #5, 8q11.2 a 8qter, 12pter a 12q12. Além disso, as seguintes regiões foram sub-representadas: 2pter a 2p12, 9pter a 9p12, 15q12 a 15qter. Tais desequilíbrios estão de acordo com a literatura (Gebhart, 2000).

No presente estudo, realizamos pela primeira vez um experimento de *knockout in vitro* do gene *PIWIL1* usando o sistema CRISPR-Cas9 na linhagem AGP01, podendo-se demonstrar que a ausência desse gene prejudicou significativamente a capacidade de migração e invasão das células. Assim, a linhagem celular AGP01 se comportou como as células de câncer gástrico previamente utilizadas em diversos trabalhos, como o de Liu *et al.* (2006), e as de adenocarcinoma de pulmão utilizadas por Xie *et al.* (2016), onde as proteínas PIWI foram relatadas como relacionadas à capacidade de migração e invasão de células cancerígenas.

Em um estudo clínico, a elevada expressão de *PIWIL1* foi encontrada associada à invasão do carcinoma espinocelular cervical (CSCC) (Liu, 2010). Nas linhagens celulares de

carcinoma hepatocelular (HCC), a expressão de PIWIL1 foi aumentada em paralelo com o potencial metastático e a depleção de PIWIL1 causou diminuição da invasão e metástase (Zhao, 2012; Xie, 2014). De forma divergente, um relatório recente indicou que o gene *PIWIL1* tem um efeito repressivo sobre invasividade celular no câncer de ovário epitelial (Lim, 2014). Portanto, vários estudos corroboram os dados que sugerem que a expressão do *PIWIL1* está fortemente associada ao aumento da agressividade das células cancerígenas.

Wang *et al.* (2014) mostraram que um dos mecanismos pelos quais o *PIWIL1* regula a migração e a invasão de células cancerígenas é através da promoção da expressão de *matrix metalloproteinase 2* (MMP2) e *matrix metalloproteinase 9* (MMP9), uma vez que o *knockdown* da proteína PIWIL1 provocou uma diminuição na expressão dessas metaloproteinases, juntamente com a diminuição da capacidade de migração e invasão das células de glioma. MMP2 e MMP9 são importantes metaloproteinases envolvidas na degradação da matriz extracelular que interagem com as moléculas de adesão celular facilitando a expansão tumoral (Rundhaug, 2005). Kessenbrock *et al.* (2010) também demonstraram que a MMP9 desempenha um papel crítico na mediação do microambiente tumoral e tem um grande papel no processo de metástase.

Em um modelo com linhagens celulares de câncer de pulmão se observou que a expressão de *PIWIL1* é ativada pela proteína 1C da família dos domínios de associação Ras, pequenas proteínas G frequentemente implicadas no crescimento e diferenciação celular, interferindo na proliferação dessas células (Reeves, 2017; Reeves, 2014). A proteína 1C da família Ras pode induzir a fosforilação de *extracellular signal-regulated kinase 1 e 2* (ERK 1/2), proteína quinase ativada por mitógeno responsável pela regulação de múltiplas proteínas de fosforilação, ativando nas células cancerígenas a via de sinalização MEK-ERK1/2 para aumentar a expressão de *PIWIL1* (Reeves, 2018). Isso resulta na autorrenovação infinita das células-tronco tumorais e, portanto, promove a tumorigênese e o desenvolvimento tumoral.

Além disso, Amaar *et al.* (2005) demonstraram que a superexpressão de *PIWIL1* regula negativamente o gene supressor de tumor *Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5* (*IGFBP5*), um membro da família de proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina e cuja expressão está envolvida na supressão da transição epitélio-mesenquimal (TEM) e redução a expressão de E-caderina (proteína de adesão celular) e HIF1 α (componente comum das vias envolvidas no controle do metabolismo celular), indicando que é criticamente relacionada com a progressão e prognóstico do câncer (Wang J, 2015; Güllü G, 2012).

Os mecanismos subjacentes à invasão e metástase de células de carcinoma, apesar de largamente desconhecidos, foram esquematizados como uma sequência de etapas discretas, muitas vezes denominada de cascata de invasão-metástase (Hanahan, 2011; Talmadge, 2010). Durante esses passos, a TEM é um proeminente programa regulatório pelo qual as células do epitélio transformado podem adquirir as habilidades de invadir, resistir à apoptose e disseminar o câncer (Hanahan, 2011).

Alguns fatores de transcrição são altamente expressos por células metastáticas e foram sugeridos para desempenhar um papel na indução da TEM (Talmadge, 2010). Estudos revelaram que a expressão de *PIWIL2* está positivamente correlacionada com o escore de Gleason e o estágio TNM de pacientes com câncer de próstata e que o gene *PIWIL2* está envolvido na invasão e metástase de células tumorais, regulando os níveis de MMP9 e modulando TEM (Yang, 2015). No entanto, o real papel das PIWIs nesta transição continua a ser investigado.

Nesse contexto, é importante destacar que a análise de dados obtidos através da técnica de proteômica (dados ainda não publicados) revelaram que o *knockout* do gene *PIWIL1* provocou uma modificação na expressão de 27 proteínas relacionadas com a TEM. Vinte e duas oncoproteínas relacionadas com a promoção da TEM, incluindo FGFR1, PCNA, ACTN4, GSN e TUBB3 estavam expressas na linhagem AGP01 antes do *knockout* e tiveram sua expressão reduzida a um nível que não foi detectado pela técnica após o *knockout*. Por outro lado, o *knockout* do gene *PIWIL1* provocou um aumento na expressão de seis proteínas envolvidas na supressão da TEM, tais como ACSM3, ADGRG1 e ANPEP, que estavam ausentes na linhagem antes do *knockout*.

Além disso, dados obtidos de nossos experimentos de expressão gênica também forneceram evidências, que corroboram os trabalhos supracitados, de que o gene *PIWIL1* desempenha um papel fundamental na migração e invasão de células cancerígenas, já que vários genes envolvidos nesses processos celulares foram observados como diferencialmente expressos quando as linhagens celulares foram comparadas antes e após o *knockout* do *PIWIL1*.

Muitos estudos têm demonstrado as atividades oncogênicas dos genes *DOCK2*, *ZNF503*, *PDE4D*, *ABL1*, *ABL2*, *LPAR1*, *SMAD2* e *WASF3* e sua relação com a agressividade do tumor em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer gástrico (Gu, 2016; Wang, 2016; Sulzmaier, 2014; Tajiri, 2017; Kulkarni, 2011; Wu, 2017; Wang, 2010; Shahi, 2015; Shahi, 2017; Yu, 2016; Sahay, 2015; Teng, 2013; Wang, 2017; Lv, 2012; Lv, 2011; Wu, 2012; Shinto, 2010). Curiosamente, o *knockout* do *PIWIL1* levou a uma diminuição da expressão

desses genes, bem como uma expressão aumentada do gene supressor de tumor *DACHI*, demonstrando que *PIWIL1* desempenha um papel crucial na via de desenvolvimento e progressão do câncer gástrico.

Zhu *et al.* (2016) relataram que a superexpressão de *DACHI* prejudicou a proliferação e a capacidade de invasão de células de adenocarcinoma pulmonar *in vitro* via regulação negativa de PRX3, uma oncoproteína necessária para a manutenção da função mitocondrial e tumorigênese (Song, 2015). A expressão de *DACHI* também inibiu a transição epitelio-mesenquimal e metástases por afetar a sinalização de TGF- β , fator de crescimento que controla diversos processos, como proliferação, diferenciação, apoptose e migração, além de diminuir a proliferação de células cancerígenas por indução da parada do ciclo celular na fase G2/M (Bu, 2016; Yan, 2014).

A regulação positiva de *DACHI* também foi observada como a possível causa de diminuição da proliferação e invasão e possível promotora de apoptose de células Hep-2 em carcinoma de células escamosas da laringe (Zhang, 2018). No trabalho de Wang *et al.* (2018), a expressão de *DACHI* foi encontrada regulada negativamente em pacientes com glioma em comparação com amostras de glioma de baixo grau e tecidos cerebrais normais. Outros dados interessantes deste estudo indicam que *DACHI* é um supressor tumoral em glioma e sua atuação é sobre a via Wnt/ β -catenina. Estes achados mostram que superexpressão de *DACHI* pode inibir a proliferação e invasividade em vários tipos de câncer e a relação da sua expressão com o *knockout* da *PIWIL1*, demonstrada por nosso trabalho, indica-o como um candidato promissor para intervenção terapêutica no câncer gástrico.

Em relação aos oncogenes relatados, Rahrmann *et al.* (2009) observaram que o *PDE4D* é superexpresso no câncer de próstata humano e demonstraram que o *knockdown* desse gene reduziu o crescimento e a migração de células de câncer de próstata *in vitro*, bem como a taxa de crescimento e proliferação xenoinxertos de câncer de próstata *in vivo* (Delyon, 2017). Delyon *et al.* (2017) demonstraram que a PDE4D também é superexpressa em linhagens de células de melanoma e apontou esse gene como um regulador da invasão celular interagindo com *FAK* através da *RACK1*, constituindo uma via de sinalização que, quando ativada, promove a progressão tumoral e metástase (Sulzmaier, 2014).

As redes de sinalização da tirosina quinase são necessárias para a regulação de múltiplos processos celulares, incluindo crescimento, sobrevivência, invasão e angiogênese e estudos recentes determinaram o papel dos membros da família ABL das tirosinas quinases, ABL1 e ABL2, durante o início e progressão de muitos tipos do tumor (Emileigh, 2013). Estas proteínas induzem a ativação de maquinaria de polimerização de actina, modulando a

expressão de várias MMPs para promover mudanças morfológicas, incluindo a formação de protruções de membrana e adesão celular alterada. Consequentemente, a ativação de *ABL1* e *ABL2* em células cancerosas promove proliferação, migração e invasão aumentadas, bem como resistência a drogas (Greuber, 2013; Wang, 2015; Gu, 2016; Wang, 2016).

O *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e outros estudos mostraram que *ABL1* e *ABL2* se encontram amplificados e/ou superexpressos em carcinoma invasivo de mama, cistoadenocarcinoma seroso ovariano, adenocarcinoma de pulmão e carcinoma espinocelular de pulmão (Cerami, 2012; Sos, 2009; Simpson, 2005). Alterações nestes genes também são encontradas no melanoma cutâneo, carcinoma urotelial da bexiga, adenocarcinoma colorretal, tumores rabdóides, bem como no carcinoma renal de células claras e medulares (Simpson, 2005; Behbahani, 2012; Koos, 2010).

As ABL quinases são necessárias para a motilidade celular e invasão induzida por IGF-1 e EGF em células de carcinoma de mama, hepatocarcinoma, melanoma e progressão do câncer de mama invasivo (Srinivasan, 2006; Ganguly, 2012; Smith-Pearson, 2010; Mader 2011, Gil-Henn, 2012; Yoon, 2010; Wang, 2015). Essas proteínas podem regular a invasão através da fosforilação direta de proteínas necessárias para o comportamento invasivo, e regulando a expressão de genes ligados à invasão e à motilidade celular (Emileigh, 2013).

DOCK2 (dedicator de cytokinesis) pertence à família DOCK de proteínas e é expresso em células hematopoiéticas (Tajiri, 2017). De acordo com Kulkarni *et al.* (2011), relatou-se que *DOCK2* ativa *Rac*, que é conhecido por regular vários processos cruciais, incluindo migração de linfócitos, ativação e diferenciação de células T (Wu, 2017). Wang *et al.* (2010) realizaram o *knockout* do *DOCK2* em uma linhagem de linfoma de células B e observaram uma diminuição na expressão de *Rac1*. Adicionalmente, a análise das curvas de crescimento de ambas as linhagens celulares demonstrou que o *knockout DOCK2* cresceu menos que *DOCK2* selvagem, como evidenciado pela menor proliferação celular.

A proteína Dock2 também foi encontrada altamente expressa em biópsias de pacientes com câncer de próstata, e seu nível de expressão se correlacionou positivamente com a proliferação da linhagem de células tumorais e foi observado o mesmo em tumores do trato digestivo (Haibi, 2011; Haibi, 2011, Chen, 2018).

O *ZNF503* é expresso na glândula mamária e em outros tecidos, e há uma alta incidência de associação entre a desregulação desse gene e a agressividade do tumor em vários tipos de tecidos, como pulmão, rim e intestino (Shahi, 2017). Shahi *et al.* (2015) realizaram ensaios de migração e invasão em duas linhagens celulares epiteliais mamárias para analisar a motilidade e a migração celular. Ambos os ensaios demonstraram que as

linhagens celulares com o *knockout* de *ZNF503* migraram menos, não fecharam as lacunas e inibiram a invasividade quando comparadas com as células controle. Estes dados indicam que o *ZNF503* promove invasão e migração celular, e altos níveis desse gene estão intimamente relacionados com a baixa sobrevida do paciente, progressão do câncer de mama e aumento da metástase.

Yu *et al.* (2016) demonstraram que o gene do receptor lisofosfatídico 1 (*LPAR1*) está relacionado à migração e invasão em ascites de câncer de ovário e é expresso em níveis mais elevados em linhagens de células metastáticas, quando comparado a linhagens celulares não-metastáticas. Eles também observaram que a presença de altos níveis de ácido lisofosfatídico está diretamente ligada à estimulação da migração celular, e o silenciamento de *LPAR1* reduziu a invasão induzida pelo ácido lisofosfatídico.

Além disso, nos tumores de mama, uma maior expressão de *LPAR1* está relacionada a uma pior sobrevida livre de metástases pulmonares (Sahay, 2015). Foi demonstrado que a sinalização de LPA através de receptores de LPA tem ação na regulação das propriedades malignas em linhagens celulares de câncer, incluindo a motilidade celular e invasão (Tsujiuchi, 2014). Um estudo recente indica que as atividades celulares e invasivas pancreáticas das células PANC-1 são estimuladas por receptores de LPA (Fukushima, 2017; Ishii, 2015; Komachi, 2009).

O *WASF3* é um gene importante que possui domínios C-terminais responsáveis pela ativação da polimerização da actina, e facilita a motilidade e a invasão celular. O *WASF3* também promove a expressão de genes envolvidos na TEM, como *ZEB1* (Teng, 2014) e membros da família das metaloproteinases de matriz (MMP) (Sossey-Alaoui, 2005), através de uma via de sinalização que regula negativamente o gene supressor de metástase *KISS1* levando à ativação do fator nuclear κ B (Teng, 2011). A proteína *WASF3* é ativada em resposta à hipóxia (Ghosha, 2012), bem como fator de crescimento e estimulação de citocinas na sinalização JAK2/STAT3 (Teng, 2013).

Honglei *et al.* (2017) mostraram que a invasividade de células de câncer de bexiga foi regulada positivamente após a ativação de uma via envolvendo *WASF3*. No câncer de pâncreas já se comprovou o envolvimento de proteínas da mesma família na promoção da invasão, migração e e invasão através da via AKT (Huang, 2018). O gene *WASF3* está normalmente superexpresso em vários tipos de tumores, como câncer de mama, osteossarcoma e câncer de próstata (Teng, 2013; Zhu, 2016).

No câncer gástrico, pouco se sabe sobre esse gene; entretanto, como microRNAs e seus alvos são considerados biomarcadores potenciais para câncer gástrico, Wang *et al.*

(2017) realizaram um ensaio de luciferase e *western blotting* para investigar a relação entre o miR-218 e o *WASF3*. Seus resultados demonstraram que a superexpressão do *WASF3* prejudica o miR-218 (que, no estudo em questão, se mostrou responsável por fazer com que a repressão celular fosse reprimida) e resulta na inibição da proliferação e migração celular, sugerindo que o *WASF3* é superexpresso no câncer gástrico e induz a proliferação e migração celular. Além disso, na qRT-PCR, os níveis de expressão de mRNA do *WASF3* foram maiores quando comparados com as linhagens celulares gástricas normais.

Smad2 é a primeira proteína intracelular na cascata de sinalização da via de sinalização do TGF- β 1, que está envolvida na progressão do câncer gástrico. Em estágios avançados de câncer, o TGF- β 1 atua como um oncogene, regulando múltiplas funções celulares, incluindo estimulação da proliferação, diferenciação e inibição da apoptose (Lv, 2012; Wu, 2012). Dai *et al.* (2018) inibiram a transição epitelio-mesenquimal das células cancerosas colorretais suprimindo a sinalização TGF- β /Smad, mostrando a relação desta proteína com a progressão da doença.

Curiosamente, Lv *et al.* (2011) observaram que os níveis de TGF- β 1 no líquido de lavagem peritoneal estão diretamente ligados à metástase peritoneal. Evidência corroborativa foi fornecida por Shinto *et al.* (2010), cujas experiências demonstraram que a expressão de p-Smad2 foi maior em tumores do tipo difuso e em casos de metástase peritoneal. Notavelmente, a linhagem celular AGP01 usada para realizar o *knockout PIWILI* em nosso estudo foi obtida de um paciente com metástase peritoneal, e encontramos *SMAD2* superexpresso.

É importante destacar que não existem trabalhos publicados na literatura que correlacionem a expressão do *PIWILI* com a expressão dos genes que se encontraram diferencialmente expressos no presente trabalho, no entanto, o fato de que a expressão desses genes foi modulada após o *knockout* do gene *PIWILI*, reforçado pelos resultados dos ensaios de migração e invasão, demonstra que este gene deve possuir um papel regulador importante sobre genes envolvidos nos processos celulares responsáveis pela TEM e, conseqüentemente, contribui para um fenótipo tumoral mais agressivo.

Em conjunto, esses dados reforçam a ideia de que o *PIWILI* desempenha um papel crucial na via de sinalização do câncer gástrico; portanto, seu uso como alvo terapêutico pode gerar resultados promissores no tratamento desta neoplasia, principalmente em pacientes com carcinomatose peritoneal, que é uma condição associada ao mau prognóstico e à diminuição da sobrevida global.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, fomos pioneiros no desempenho de um *knockout in vitro* do gene *PIWIL1* usando o sistema CRISPR-Cas9, e descobrimos que a ausência desse gene prejudicou significativamente a capacidade de migração e invasão da linhagem AGP01 e modificou a expressão de potenciais alvos moleculares envolvidos no processo de transição eptélio-mesenquimal.

Os resultados de tais experimentos contribuíram para a compreensão dos mecanismos utilizados pela *PIWIL1* para promover alterações na capacidade de migração e invasão de células gástricas durante a carcinogênese, e revelaram a participação de novos atores relacionados à expressão de *PIWIL1*, como *FGFR1*, *PCNA*, *ACTN4*, *PDE4D* e *SMAD2*.

Nossos resultados demonstraram que o *knockout de PIWIL1* promove diversas alterações no fenótipo celular, sugerindo o papel crítico do oncogene *PIWIL1* no CG, e confirmaram a hipótese de que a hiperexpressão de *PIWIL1* promove a migração, a invasividade e a TEM, mostrando-se como um potencial biomarcador de prognóstico por seu papel na agressividade tumoral.

8 REFERÊNCIAS

AMAAR YG, BAYLINK DJ, MOHAN S. Ras-association domain family 1 protein, RASSF1C, is an IGFBP-5 binding partner and a potential regulator of osteoblast cell proliferation. *J Bone Miner Res.* 2005; 20:1430-1439.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/stomachcancer/detailedguide/stomach-cancer-risk-factors>>. Acessado em: 25 de outubro de 2017.

AMITAI, G.; SOREK, R. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 2, p. 67–76, 2016.

ARREGI, M. M. U. et al. Perfil clínico epidemiológico das neoplasias de estômago atendidas no hospital do câncer do instituto do câncer do Ceará, no período de 2000-2004. *Rev. Bras.de Cancerologia.* 2009,55(2): 121-128.

ASSUMPÇÃO, C.; CALCAGNO, D.; ARAÚJO, T.; et al. The role of piRNA and its potential clinical implications in cancer. *Epigenomics*, v. 7, n. 6, p. 1–10, 2015.

AZARHOUSH, R.; KESHTKAR A.A.; AMIRIANI T.; KAZEMI-NEJAD V. Relationship between p53. Expression and Gastric Cancers in Cardia and Antrum. *Archives of Iranian Medicine*, 2008; 11(5):502-506.

BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, RICHARDS M, BOYAVAL P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819):1709–12

BENJAMINI Y, HOCHBERG Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc.* 1995; 57:289-300.

BEHBAHANI TE, et al. Tyrosine kinase expression profile in clear cell renal cell carcinoma. *World J. Urol.* 2012; 30:559–65.

BLOOMFIELD M, DUESBERG P. Karyotype alteration generates the neoplastic phenotypes of SV40-infected human and rodent cells. *Mol Cytogenet.* 2015; 8:79.

BROUNS SJJ, JORE MM, LUNDGREN M, WESTRA ER, SLIJKHUIS RJH. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321(5891):960–64

BU XN, QIU C, WANG C, JIANG Z. Inhibition of DACH1 activity by short hairpin RNA represses cell proliferation and tumor invasion in pancreatic cancer. *Oncol Rep.* 2016; 36:745-754.

CALCAGNO, DQ; ERS, MOTA; FC MOREIRA; SBM DE SOUSA; RR BURBANO; PP ASSUMPÇÃO. Role of PIWI-Interacting RNA (piRNA) as Epigenetic Regulation. *Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics.* Springer International publishing AG. 2017.

- CARLSON M. *org.Hs.eg. db: Genome wide annotation for Human*; 2017; R package version 3.5.0.
- CERAMI E, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012; 2:401–4.
- CHARPENTIER E, DOUDNA JA. 2013. Biotechnology: rewriting a genome. *Nature* 495(7439):50–51
- CHARPENTIER E, MARRAFFINI LA. 2014. Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Curr. Opin. Microbiol.* 19:114–19
- CHEN Z, CHE Q, HE X, WANG F, WANG H, ZHU M, SUN J, WAN X. Stem cell protein Piwil1 endowed endometrial cancer cells with stem-like properties via inducing epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* 2015; 15:811.
- CONG L, RAN FA, COX D, LIN S, BARRETTO R, et al. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121): 819–23
- COVER TL, PEEK RM. Diet, microbial virulence, and *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Gut Microbes* 2013; 4:482–93.
- COX DN, CHAO A, BAKER J, CHANG L, QIAO D, LIN H. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. 1998 *Genes Dev.* 12: 3715–3727
- DAI G, SUN B, GONG T, PAN Z, MENG Q, JU W. Ginsenoside Rb2 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells by suppressing TGF- β /Smad signaling. *Phytomedicine.* Volume 56, Pages 126-135.
- DELYON J, SERVY A, LAUGIER F, ANDRÉ J, ORTONNE N, BATTISTELLA M, MOURAH S, BENSUSSAN A, LEBBÉ C, DUMAZ N. PDE4D promotes FAK-mediated cell invasion in BRAF-mutated melanoma. *Oncogene.* 2017; 36:3252-3262
- DIKKEN, J.L.; VAN DE VELDE C. J.; COIT D. G.; SHAH M. A.; VERHEIJ M.; CATS A. Treatment of rectable gastric cancer. *Therap Adv Gastroenterol*, 2012; 5(1):49-69.
- DICKEN, B. J.; BIGAM D.L.; CASS C. MACKAY J.R.; JOY AA.; HAMILTO S. M. Gastric adenocarcinoma Review and considerations for Future Directions. *Ann surg*, 2005; 241(1):27–39.
- DOMINGUEZ AA, LIM WA, QI LS. 2016. Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17(1): 5–15
- DOUDNA JA, CHARPENTIER E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346(6213):1258096
- FALCON S, GENTLEMAN R. Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics.* 2007; 23:257-258.

- FARAZI TA, JURANEK SA AND TUSCHL T. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development*. 135:1201–1214. 2008.
- FRANK, N. Y.; SCHATTON, T.; FRANK, M. H. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 1, p. 41–50, 2010
- FUGUO JIANG, JENNIFER A, DOUDNA. Annu. Rev. Biophys. 2017. 46:505–29. A Review in Advance on CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*. Online at biophys.annualreviews.org. 062215-010822
- FUKUSHIMA K, TAKAHASHI K, YAMASAKI E. Lysophosphatidic acid signaling via LPA1 and LPA3 regulates cellular functions during tumor progression in pancreatic cancer cells. *Exp Cell Res*. 2017; 352:139–145.
- GANGULY SS. c-Abl and Arg are activated in human primary melanomas, promote melanoma cell invasion via distinct pathways, and drive metastatic progression. *Oncogene*. 2012; 31:1804–
- GAO CL, SUN R, LI DH, GONG F. PIWI-like protein 1 upregulation promotes gastric cancer invasion and metastasis. *Onco Targets Ther*. 2018; 11:8783-8789.
- GARNEAU JE, DUPUIS M-E, VILLION M, ROMERO DA, BARRANGOU R, ET AL. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468(7320):67–71.
- GEBERT D, ROSENKRANZ D. RNA-based regulation of transposon expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2015;6(6):687–708.
- GEBHART E, LIEHR T. Patterns of genomic imbalances in human solid tumors (Review). *Int J Oncol*. 2000; 16:383-399.
- GIL-HENN H. Arg/Abl2 promotes invasion and attenuates proliferation of breast cancer in vivo. *Oncogene*. 2012; 31:1804–1816.
- GHILDIYAL, M., ZAMORE, P.D., 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*. 10, 94-108
- GHOSHAL P, TENG Y, LESOON LA, COWELL JK. HIF1A induces expression of the WASF3 metastasis-associated gene under hypoxic conditions. *Int J Cancer*. 2012 Sep 15; 131(6):E905-15.
- GREUBER EK, SMITH-PEARSON P, WANG J, PENDERGAST AM. Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13:559-571
- GROCHOLA, L.F., GREITHER, T., TAUBERT, H., MOLLER, P., KNIPPSCHILD, U., UDELNOW, A., HENNE-BRUNS, D., WURL, P., 2008. The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour-related death. *Br J Cancer*. 99, 1083-8.

GU JJ, ROUSE C, XU X, WANG J, ONAITIS MW, PENDERGAST AM. Inactivation of ABL kinases suppresses non-small cell lung cancer metastasis. *JCI Insight*. 2016;1:e89647.

GÜLLÜ G, KARABULUT S, AKKIPRIK M. Functional roles and clinical values of insulin-like growth factor-binding protein-5 in different types of cancers. *Chin J Cancer*. 2012; 31:266-280.

HAIBI, C. P., NISHIHARA, H., KIMURA, T., KATO, Y., TANINO, M. AND NISHIO, M., CXCL13 mediates prostate cancer cell proliferation through JNK signalling and invasion through ERK activation. *Cell Prolif*. 2011. 44: 311–319

HALE CR, ZHAO P, OLSON S, DUFF MO, GRAVELEY BR, et al. 2009. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* 139(5):945–56

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011, 144: 646–674.

HEJNA, M.; WOHRER S.; SCHMIDINGER M.; RADERER M. Postoperative chemotherapy for gastric cancer. *Oncologist*, 2006; 11(2):136-45.

HENRY CE, LLAMOSAS E, DJORDJEVIC A, HACKER NF, FORD CE. Migration and invasion is inhibited by silencing ROR1 and ROR2 in chemoresistant ovarian cancer. *Oncogenesis*. 2016;5:e226.

HENRY C, LLAMOSAS E, KNIPPRATH-MESZAROS A, SCHOETZAU A, OBERMANN E, FUENFSCHILLING M, CADUFF R, FINK D, HACKER N, WARD R. Targeting the ROR1 and ROR2 receptors in epithelial ovarian cancer inhibits cell migration and invasion. *Oncotarget*. 2015; 6:40310-40326.

HOUWING, S., KAMMINGA, L.M., BEREZIKOV, E., CRONEMBOLD, D., GIRARD, A., VAN DEN ELST, H., FILIPPOV, D.V., BLASER, H., RAZ, E., MOENS, C.B., PLASTERK, R.H., HANNON, G.J., DRAPER, B.W., KETTING, R.F., 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell*. 129, 69-82.

HUANG S, HUANG C, CHEN W, LIU Y, YIN X, LAI J, LIANG L, WANG Q, WANG A, ZHENG C. WAVE3 promotes proliferation, migration and invasion via the AKT pathway in pancreatic cancer. *Int J Oncol*. 2018; 53(2):672-684.

HUANG, R. Y., GUILFORD, P. & THIERY, J. P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci*. 125, 4417–4422 (2012).

HUTVAGNER, G., SIMARD, M.J., 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9, 22-32.

HSU PD, LANDER ES, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014; 157:1262-1278.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2018/ Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>. Acessado: 10 de janeiro de 2019.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Câncer de Estômago. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-estomago>. Acessado: 10 de janeiro de 2019.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Números do Câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer> Acessado: 10 de janeiro de 2019a.

ISHII S, HIRANE M, FUKUSHIMA K. Diverse effects of LPA4, LPA5 and LPA6 on the activation of tumor progression in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 461:59–64.

JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr; 61(2):69-90.

JIANG F, DOUDNA JA. 2015. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 30:100–11

JJARUI Z, XIUXIA R, BO W, JING C, Linli T. Effect of DACH1 on proliferation and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Face Med*. 2018; 14: 20.

JIN H, XIE Q, GUO X, XU J, WANG A, LI J, ZHU J, WU X, HUANG H, HUANG C. p63 α protein up-regulates heat shock protein 70 expression via E2F1 transcription factor 1, promoting Wasf3/Wave3/MMP9 signaling and bladder cancer invasion. *J Biol Chem*. 2017. 292(38): 15952–15963.

JINEK M AND DOUDNA JÁ. A three dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*. 457:405–412. 2009.

JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337:816-821.

JULIANO CE, REICH A, LIU N, et al. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs function in Hydra somatic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(1):337–342.

KALLURI, R., AND NEILSON, E.G. 2003. Epithelialmesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest*. 112:1776–1784.

KARIMI P, ISLAMI F, ANANDASABAPATHY S, FREEDMAN ND, KAMANGAR F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2014; 23:700–13

KESSENBROCK K, PLAKS V, WERB Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010, 141: 52–67.

KNUDSON AG (1985). Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Research*, 45(4):1437-1443.

KOMACHI M, TOMURA H, MALCHINKHUU E. LPA1 receptors mediate stimulation, whereas LPA2 receptors mediate inhibition, of migration of pancreatic cancer cells in response to lysophosphatidic acid and malignant ascites. *Carcinogenesis*. 2009;30: 457–465.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK S. J.; BRZOZOWSKI T. Helicobacter Pylori Infection In Gastric Cancerogenesis. *Journal of Physiology*, 2009; 60(3):3-21

KOOS B, et al. The tyrosine kinase c-Abl promotes proliferation and is expressed in atypical teratoid and malignant rhabdoid tumors. *Cancer*. 2010; 116:5075–81

KULKARNI K, YANG J, ZHANG Z, BARFORD D. Multiple factors confer specific Cdc42 and Rac protein activation by dedicator of cytokinesis (DOCK) nucleotide exchange factors. *J Biol Chem*. 2011; 286:25341-25351.

KUNZ PL, GUBENS M, FISHER GA, FORD JM, LICHTENSZTAJN DY, CLARKE CA. Long-term survivors of gastric cancer: a California population-based study. *J Clin Oncol* 2012; 30:3507–15

KURAMOCHI-MIYAGAWA, S; KIMURA, T; IJIRI, TW; ASADA, N; FUJITA, Y; IKAWA, M; IWAI, N; OKABE, M; DENG, W; LIN, H; MATSUDA, Y; NAKANO. T. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis *Development* 2004 131: 839-849.

LAMOUILLE, S; XU, J; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. 2014. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* volume 15, pages 178–196 (2014)

LEAL, M.F.; NASCIMENTO, J.L.M.; SILVA, C.E.A; LAMARÃO, M.F.V.; CALCAGNO, D.Q.; KHAYAT, A.S.; ASSUMPCÃO, P.P.; CABRAL, I.R.; SMITH, M.A.C.; BURBANO, R.R. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2009; 195: 85-91.

LI, S., MENG, L., ZHU, C., WU, L., BAI, X., WEI, J., LU, Y., ZHOU, J., MA, D., 2010. The universal overexpression of a cancer testis antigen hiwi is associated with cancer angiogenesis. *Oncol Rep*. 23, 1063-8.

LI C, ZHOU X, CHEN J, LU Y, SUN Q, TAO D, HU W, ZHENG X, BIAN S, LIU Y. PIWIL1 destabilizes microtubule by suppressing phosphorylation at Ser16 and RLIM-mediated degradation of Stathmin1. *Oncotarget*. 2015; 6:27794-27804.

LIANG D, FANG Z, DONG M, et al: Effect of RNA interference-related HiWi gene expression on the proliferation and apoptosis of lung cancer stem cells. *Oncol Lett*. 4:146–150. 2012.

LIAKAKOS, T.; ROUKOS D.H. More Controversy than Ever – Challenges and Promises Towards Personalized Treatment of Gastric Cancer. *Annals of Surgical Oncologic*, 2008; 15 (4) 956–960.

LIEHR T, HELLER A, STARKE H, RUBTSOV N, TRIFONOV V, MRASEK K, WEISE A, KUECHLER A, CLAUSSEN U. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med*. 2002; 9:335-339.

LIEHR T. The Standard FISH Procedure. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) - Application Guide. Berlin. *Springer*. 2017;109-118.

LIM SM, LIM JY AND CHO JY: Targeted therapy in gastric cancer: Personalizing cancer treatment based on patient genome. *World J Gastroenterol* 20: 2042-2050, 2014.

LIM SL, RICCIARDELLI C, OEHLER MK, TAN IM, RUSSELL D, GRUTZNER F. Overexpression of piRNA pathway genes in epithelial ovarian cancer. *PLoS One* 2014, 9: e99687.

LIMA, E. M.; RISSINO J. D.; HARADA, M. L., ASSUMPÇÃO, P. P.; DEMACHKI, S.; GUIMARAES, A. C.; CASSARTELLI, C.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R. Conventional cytogenetic characterization of a new cell line, ACP01, established from a primary human gastric tumor. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37: 1831-1838.

LITWIN M, SZCZEPAŃSKA-BUDA A, PIOTROWSKA A, DZIEGIEL P, WITKIEWICZ W. The meaning of PIWI proteins in cancer development. *Oncol Lett*. 2017; 13:3354-3362.

LIU X, SUN Y, GUO J, MA H, LI J, DONG B, JIN G, ZHANG J, WU J, MENG L. Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *Int J Cancer*. 2006; 118:1922-1929.

LIU WK, JIANG XY, ZHANG ZX. Expression of PSCA, PIWIL1 and TBX2 and its correlation with HPV16 infection in formalin-fixed, paraffinembedded cervical squamous cell carcinoma specimens. *Arch Virol* 2010, 155: 657–663.

LV ZD, NA D, MA XY, ZHAO C, ZHAO WJ, XU HM. Human peritoneal mesothelial cell transformation into myofibroblasts in response to TGF- β 1 in vitro. *Int J Mol Med*. 2011; 27:187-193.

LV ZD, WANG HB, LI FN, WU L, LIU C, NIE G, KONG B, QU HL, LI JG. TGF- β 1 induces peritoneal fibrosis by activating the Smad2 pathway in mesothelial cells and promotes peritoneal carcinomatosis. *Int J Mol Med*. 2012; 29:373-379.

MAARTJE J. LUTEIJN & RENÉ F. KETTING. PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics 2013. *Nature Reviews Genetics* volume 14, pages 523–534

MAKAROVA KS, GRISHIN NV, SHABALINA SA, WOLF YI, KOONIN EV. 2006. A putative RNA-interferencebased immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* 1:7

MARANO L, POLOM K, PATRITI A, ROVIELLO G, FALCO G, STRACQUALURSI A, DE LUCA R, PETRIOLI R, MARTINOTTI M, GENERALI D, *et al*: Surgical management of advanced gastric cancer: An evolving issue. *Eur J Surg Oncol*. 42:18–27. 2016

MARRAFFINI LA, SONTHEIMER EJ. 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 322(5909):1843–45

MARTEL, C.; FORMAN D.; PLUMMER M. (Gastric cancer: epidemiology and risk factors. *Gastroenterol Clin North Am*, 2013; 42(2):219-40.

DENIZ M. OZATA, ILDAR GAINETDINOV, ANSGAR ZOCH, DÓNAL O’CARROLL & PHILLIP D. ZAMORE. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. 2018. *Nature Reviews Genetics* volume 20, pages89–108

PATEL, A.; TRIPATHI G.; GOPALAKRISHNAN K.; WILLIAMS N.; ARASARADNAM R. P. Field cancerisation in colorectal cancer: a new frontier or pastures past? *World J Gastroenterol* 2015; 21(13):3763-72.

PEINADO, H., OLMEDA, D. & CANO, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Rev. Cancer* 7, 415–428 (2007)

PIAZUELO, M.B.; CORREA P. Gastric cancer: Overview. *Colomb. Med. (Cali.)*, 2013; 44(3):192–201.

QIAO D., ZEEMAN A.-M., DENG W., LOOIJENGA L.H.J., LIN H. Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene* 21:3988-3999(2002)

RAHRMANN EP, COLLIER LS, KNUTSON TP, DOYAL ME, KUSLAK L, GREEN LE, MALINOWSKI RL, ROETHE L, AKAGI K, WAKNITZ M. Identification of PDE4D as a proliferation promoting factor in prostate cancer using a Sleeping Beauty transposon-based somatic mutagenesis screen. *Cancer Res.* 2009; 69:4388-4397.

REEVES ME, BALDWIN ML, ARAGON R, ET AL. RASSF1C modulates the expression of a stem cell renewal gene, PIWIL1. *BMC Res Notes.* 2012; 5:239.

REEVES ME, FIREK M, CHEN ST, AMAAR YG. Evidence that RASSF1C stimulation of lung cancer cell proliferation depends on IGFBP-5 and PIWIL1 expression levels. *PLoS One.* 2014;9(7):e101679.

REEVES ME, FIREK M, JLIEDI A, AMAAR YG. Identification and characterization of RASSF1C piRNA target genes in lung cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8(21):34268–34282.

RIBEIRO, H. F.; ALCÂNTARA, D. F. A.; MATOS, L. A.; SOUSA, J. M. C.; LEAL, M. F.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R.; BAHIA, M. O. Cytogenetic characterization and evaluation of c-MYC gene amplification in PG100, a new Brazilian gastric cancer cell line. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2010; 43:717-721.

RIORDAN SM, HERUTH DP, ZHANG LQ, YE SQ. Application of CRISPR/Cas9 for biomedical discoveries. *Cell Biosci.* 2015; 5:33.

ROSS, RJ ; WEINER, MM; LIN, H. PIWI proteins and PIWI–interacting RNAs in the soma *Nature.* 2014 January 16; 505(7483): 353–359.

RUNDHAUG JE. Matrix Metalloproteinases and Angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005; 9:267-285.

SAHAY D, LEBLANC R, GRUNEWALD TG, AMBATIPUDI S, RIBEIRO J, CLÉZARDIN P, PEYRUCHAUD O. The LPA1/ZEB1/miR-21-activation pathway regulates metastasis in basal breast cancer. *Oncotarget.* 2015; 6:20604-20620.

SADIKOVIC, B.; AL-ROMAIIH A. L. K.; SQUIRE J. A.; ZIELENSKA M. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. Sadikovic B1 *Curr Genomics.* 2008; 9(6):394-408.

SATO K, SIOMI H. Chapter Seven - PIWI Proteins and Their Slicer Activity in piRNA Biogenesis and Transposon Silencing. *The Enzymes, Volume 32, 2012, Pages 137-162*

SCHWARZ RE. Current status of management of malignant disease: current management of gastric cancer. *J Gastrointest Surg.* 2015;19(4):782–788.

SHAHI P, SLORACH EM, WANG CY, CHOU J, LU A, RUDERISCH A, WERB Z. The Transcriptional Repressor ZNF503/Zepo2 Promotes Mammary Epithelial Cell Proliferation and Enhances Cell Invasion. *J Biol Chem.* 2015; 290:3803-3813

SHAHI P, WANG CY, LAWSON DA, SLORACH EM, LU A, YU Y, LAI MD, GONZALEZ VELOZO H, WERB Z. ZNF503/Zpo2 drives aggressive breast cancer progression by down-regulation of GATA3 expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017; 114:3169-3174.

SHALEM O, SANJANA NE, ZHANG F. 2015. High-throughput functional genomics using CRISPR–Cas9. *Nat. Rev. Genet.* 16(5): 299–311

SHARMA A.K., NELSON M.C., BRANDT J.E., WESSMAN M., MAHMUD N., WELLER K.P., HOFFMAN R. Human CD34+ stem cells express the hiwi gene, a human homologue of the Drosophila gene piwi. *Blood* 97:426-434(2001)

SHINTO O, YASHIRO M, TOYOKAWA T, NISHII T, KAIZAKI R, MATSUZAKI T, NODA S, KUBO N, TANAKA H, DOI Y. Phosphorylated smad2 in advanced stage gastric carcinoma. *BMC Cancer.* 2010; 10:652.

SOSSEY-ALAOUI K, LI X, RANALLI TA, COWELL JK. WAVE3-mediated cell migration and lamellipodia formation are regulated downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 2005 Jun 10; 280(23):21748-55.

SIDDIQI S, MATUSHANSKY I. Piwis and piwi-interacting RNAs in the epigenetics of cancer. *J Cell Biochem.* 2012; 113:373-380.

SIDDIQI S, TERRY M, MATUSHANSKY I. Hiwi mediated tumorigenesis is associated with DNA hypermethylation. *PLoS One.* 2012;7:e33711

SIMON B, KIRKPATRICK JP, ECKHARDT S, REUTER M, ROCHA EA, ANDRADE-NAVARRO MA, SEHR P, PILLAI RP AND CARLOPAMGNO T. Recognition of 2'-O-

methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein. *Structure*. 19:172–180. 2011

SULZMAIER FJ, JEAN C, SCHLAEPFER DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14:598-610.

SUN R, GAO CL, LI DH, LI BJ, DING YH. Expression Status of PIWIL1 as a Prognostic Marker of Colorectal Cancer. *Dis Markers*. 2017; 2017:1204937.

SUZUKI, R., HONDA, S., KIRINO, Y., 2012. PIWI Expression and Function in Cancer. *Front Genet*. 3, 204.

SIMPSON L, et al. Renal medullary carcinoma and ABL gene amplification. *J. Urol*. 2005; 173:1883–8.

SMITH-PEARSON PS, GREUBER EK, YOGALINGAM G, PENDERGAST AM. Abl kinases are required for invadopodia formation and chemokine-induced invasion. *J. Biol. Chem*. 2010; 285:40201–11.

SOS ML, et al. Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J. Clin. Invest*. 2009; 119:1727–40.

SRINIVASAN D, PLATTNER R. Activation of Abl tyrosine kinases promotes invasion of aggressive breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006; 66:5648–55.

SUGIMOTO K, KAGE H, AKI N, et al. The induction of H3K9 methylation by PIWIL4 at the p16Ink4a locus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(3):497–502.

TAKAHASHI T.; SAIKAWA Y.; KITAGAWA Y. Gastric cancer: current status of diagnosis and treatment *Cancers (Basel)*, 2013; 5(1):48-63.

TALMADGE JE, FIDLER IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 2010, 70: 5649–5669.

TAN Y, LIU L, LIAO M, ZHANG C, HU S, ZOU M, GU M, LI X. Emerging roles for PIWI proteins in cancer. Review *Acta Biochimica et Biophysica Sinica Advance*, 2015

TENG Y, LIU M, COWELL JK. Functional interrelationship between the WASF3 and KISS1 metastasis-associated genes in breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2011 Dec 15; 129(12):2825-35.

TENG Y, GHOSHAL P, NGOKA L, MEI Y, COWELL JK. Critical role of the WASF3 gene in JAK2/STAT3 regulation of cancer cell motility. *Carcinogenesis*. 2013; 34:1994-1999.

TENG Y, MEI Y, HAWTHORN L, COWELL JK. WASF3 regulates miR-200 inactivation by ZEB1 through suppression of KISS1 leading to increased invasiveness in breast cancer cells. *Oncogene*. 2014 Jan 9; 33(2):203-11.

THIERY, J. P. & SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–142 (2006).

THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890 (2009).

TSUJIUCHI T, HIRANE M, DONG Y. Diverse effects of LPA receptors on cell motile activities of cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 2014; 34:201–204.

VAN DER OOST J, WESTRA ER, JACKSON RN, WIEDENHEFT B. 2014. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(7):479–92

VICENTE-MANZANARES M, HORWITZ AR. Cell migration: an overview. *Methods Mol Biol.* 2011; 769:1-24. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_1.

VOGELSTEIN B, KINZLER KW (1993). The multistep nature of cancer. *TIG*, 9(4):138-141.

XIE Y, YANG Y, JI D, ZHANG D, YAO X, ZHANG X. Hiwi downregulation, mediated by shRNA, reduces the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep* 2015, 11: 1455–1461.

XIE K, ZHANG K, KONG J, WANG C, GU Y, LIANG C, JIANG T, QIN N, LIU J, GUO X. Cancer-testis gene PIWIL1 promotes cell proliferation, migration, and invasion in lung adenocarcinoma. *Cancer Med.* 2018; 7:157-166.

WANG L, NISHIHARA H, KIMURA T, KATO Y, TANINO M, NISHIO M, OBARA M, ENDO T, KOIKE T, TANAKA S. DOCK2 regulates cell proliferation through Rac and ERK activation in B cell lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 395:111-115.

WANG Y, LIU Y, SHEN X, ZHANG X, CHEN X, YANG C, GAO H. The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012; 5:315-325

WANG X, TONG X, GAO H, YAN X, XU X, SUN S, WANG Q, WANG J. Silencing HIWI suppresses the growth, invasion and migration of glioma cells. *Int J Oncol.* 2014; 45:2385-2392.

WANG J, DING N, LI Y, CHENG H, WANG D, YANG Q, DENG Y, YANG Y, LI Y, RUAN X. Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) functions as a tumor suppressor in human melanoma cells. *Oncotarget.* 2015; 6:20636-20649.

WANG J, PENDERGAST AM. The Emerging Role of ABL Kinases in Solid Tumors. *Trends Cancer.* 2015; 1:110-123.

WANG H, LA RUSSA M, QI LS. 2016. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* 85: 227–64

WANG J, ROUSE C, JASPER JS, PENDERGAST AM. ABL kinases promote breast cancer osteolytic metastasis by modulating tumor-bone interactions through TAZ and STAT5 signaling. *Sci Signal*. 2016;9:ra12

WANG G, FU Y, LIU G, YE Y, ZHANG X. miR-218 Inhibits Proliferation, Migration, and EMT of Gastric Cancer Cells by Targeting WASF3. *Oncol Res*. 2017; 25:355-364.

WANG X, SUN S, TONG X, et al. MiRNA-154-5p inhibits cell proliferation and metastasis by targeting PIWIL1 in glioblastoma. *Brain Res*. 2017; 1676:69–76.

WADHWA R, TAKETA T, SUDO K, BLUM MA, AJANI JÁ. Modern oncological approaches to gastric adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am*. 2013 Jun; 42(2):359-69.

WASHINGTON K. 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: stomach. *Ann Surg Oncol*, 2010; 17(12):3077-3079.

WEBPATHOLOGY. VISUAL SURVEY OF SURGICAL PATHOLOGY. Disponível em: <http://www.webpathology.com>. Acessado em: 26 de outubro de 2017

WIEDENHEFT B, STERNBERG SH, DOUDNA JA. 2012. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482(7385):331–38

WHO. World Health Organization. Noncommunicable diseases. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/> Acessado em: 10 de janeiro de 2019a.

WHO. World Health Organization. The Global Cancer Observatory. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf> Acessado em: 10 de janeiro de 2019b

WHO. World Health Organization. Facts about Cancer. Disponível em: <https://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/> Acessado em: 10 de janeiro de 2019c

WU M, SMALL D, DUFFIELD AS. DOCK2: A novel FLT3/ITD leukemia drug target. *Oncotarget*. 2017; 8:88253-88254.

WU Y, LI Q, ZHOU X, YU J, MU Y, MUNKER S, XU C, SHEN Z, MÜLLENBACH R, LIU Y. Decreased levels of active SMAD2 correlate with poor prognosis in gastric cancer. *PLoS One*. 2012; 7:e35684.

YANJIA, H; XINCHUN, J. The role of epithelial–mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma and oral submucous fibrosis. *Clinica Chimica Acta*. Volume 383, Issues 1–2, August 2007, Pages 51-56

YAN W, WU K, HERMAN JG, BROCK MV, ZHOU Y, LU Y, ZHANG Z, YANG Y, GUO M. Epigenetic silencing of DACH1 induces the invasion and metastasis of gastric cancer by activating TGF- β signalling. *J Cell Mol Med*. 2014; 18:2499-2511.

YANFENG Y, XUEPEI Z, DONGKUI S, JINXING W. Piwil2 modulates the invasion and metastasis of prostate cancer by regulating the expression of matrix metalloproteinase-9 and epithelial-mesenchymal transitions. *Oncol Lett.* 2015 Sep; 10(3): 1735–1740.

YAYUN CHEN FAN MENG BINGYU WANG LIANGMEI HE YANGBIN LIU ZHIPING LIU. 2018. DOck 2 in the development of inflammation and câncer. *Europeand Journal of Immunology.* Volume 48, Issue 6. Pages 915-922

YOON CH. Claudin-1 acts through c-Abl-protein kinase Cdelta (PKCdelta) signaling and has a causal role in the acquisition of invasive capacity in human liver cells. *J. Biol. Chem.* 2010; 285:226–33.

YU X, ZHANG Y, CHEN H. LPA receptor 1 mediates LPA-induced ovarian cancer metastasis: an in vitro and in vivo study. *BMC Cancer.* 2016; 16:846.

ZENG L, ZHANG Q, YAN K, ZHOU MM. Structural insights into piRNA recognition by the human PIWI-like 1 PAZ domain. *Proteins.* 2011;79(6):2004–2009.

ZHAO YM, ZHOU JM, WANG LR, HE HW, WANG XL, TAO ZH, SUN HC. HIWI is associated with prognosis in patients with hepatocelular carcinoma after curative resection. *Cancer* 2011, 118: 2708–2717

ZHU Z, CHEN W, YIN X, LAI J, WANG Q, LIANG L, WANG W, WANG A, ZHENG C. WAVE3 Induces EMT and Promotes Migration and Invasion in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Dig Dis Sci.* 2016; 61:1950-1960.

9 ANEXOS

Tabela Suplementar 1 Membros da Subfamília PIWI (Fonte: UniProt.org).

Proteína	Gene	Organismo	Comprimento	Sinônimos	Cromossomo
Piwi-like protein 2	<i>piwil2</i>	Xenopus tropicalis (Rã)	949	-	-
Piwi-like protein 1	<i>wi-1</i>	Schmidtea mediterranea (Planária)	808	-	-
Piwi-like protein 2	<i>wi-2</i>	Schmidtea mediterranea (Planária)	833	-	-
Piwi-like protein 4	<i>Piwil4</i>	Rattus norvegicus (Rato)	848	-	-
Piwi-like protein 2	<i>piwil2</i>	Oncorhynchus mykiss (Truta-arco-íris)	1054	rtili	-
Piwi-like protein 1	<i>Piwil1</i>	Mus musculus (Camundongo)	862	Miwi	5
Piwi-like protein 2	<i>Piwil2</i>	Mus musculus (Camundongo)	971	Mili	14
Piwi-like protein 4	<i>Piwil4</i>	Mus musculus (Camundongo)	848	Miwi2	9
Piwi-like protein 1	<i>PIWIL1</i>	Homo sapiens	861	HIWI	12
Piwi-like protein 2	<i>PIWIL2</i>	Homo sapiens	973	HILI	8
Piwi-like protein 4	<i>PIWIL4</i>	Homo sapiens	852	HIWI2 PIWI	11
Piwi-like protein 3	<i>PIWIL3</i>	Homo sapiens	882	-	22
Piwi-like protein 1	<i>PIWIL1</i>	Gallus gallus (Galinha)	867	-	15
Piwi-like protein	<i>iwi</i>	Dugesia japonica (Planária - Ásia)	818	-	-
Protein piwi	<i>piwi</i>	Drosophila melanogaster	843	-	2L
Protein aubergine	<i>aub</i>	Drosophila melanogaster	866	-	2L
Protein argonaute-3	<i>ago/03</i>	Drosophila melanogaster	867	-	3L
Piwi-like protein 2	<i>piwil2</i>	Danio rerio (Zebrafish)	1046	zili	5
Piwi-like protein 1	<i>piwil1</i>	Danio rerio (Zebrafish)	858	ziwi	8
Piwi-like protein ergo-1	<i>ergo-1</i>	Caenorhabditis elegans	1121	-	V
Piwi-like protein Siwi	<i>Siwi</i>	Bombyx mori (Bicho-da-seda)	899	-	-
Piwi-like protein Ago3	<i>AGO3</i>	Bombyx mori (Bicho-da-seda)	926	-	-

Tabela Suplementar 2 Classificação do TNM patológico (Washington et al., 2010).

pT	Tumor Primário
TX	O tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria.
T1	Tumor invade a lâmina própria, muscular da mucosa ou submucosa.
T1a	Tumor invade a lâmina própria ou muscular da mucosa.
T1b	Tumor invade a submucosa.
T2	Tumor invade a muscular própria.
T3	Tumor que invade a serosa. Tumor penetra no tecido conjuntivo subseroso sem invasão do peritônio visceral ou estruturas adjacentes. Também se incluem aqueles que se estendem ao gástrico ou ligamentos gastrohepáticos, ou para o omento maior ou menor, sem perfuração do peritônio visceral que cobre estas estruturas.
T4	Tumor invade a serosa (peritônio visceral) ou invade estruturas adjacentes.
T4A	Tumor invade a serosa (peritônio visceral).

T4b	Tumor invade estruturas adjacentes como baço, cólon transverso, fígado, diafragma, pâncreas, parede abdominal, glândula adrenal, rim, intestino delgado e retroperitônio.
pN	Linfonodos Regionais
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
N1	Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais
N2	Metástase em 3 a 6 linfonodos regionais.
N3	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais.
pM	Metástase à Distância
MX	A metástase não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

Tabela Suplementar 3: Grupamento por estadios (Washington et al., 2010).

Estadiamento	Combinações TNM		
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Estadio IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Estadio IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Estadio IIIB	T4b	N0-1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Estadio IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2-3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Tabela Suplementar 4: Genes diferencialmente expressos (DE) quando comparados na linhagem celular antes e após o knockout *PIWILI*.

Nome da Probe	Símbolo do Gene	Fold-Change	P Value	P Ajustado
A_24_P215804	CKLF	0.2315	7.32E+09	0.0053
A_21_P0013109	XLOC_12_013153	0.3181	0.0029	0.0324
A_21_P0010885	TMEM14B	228.738.161.870.967	0.0030	0.0328
A_33_P3228014	SCGB1D4	0.3190	0.0079	0.0395
A_24_P54390	RASGRP3	0.3250	0.0160	0.0488
A_24_P187056	ANKRD20A12P	0.3966	0.0013	0.0235
A_19_P00318261	SNORA26	0.4725	0.0052	0.0379
A_23_P146146	ATP6V0D2	0.3876	0.0007	0.0185
A_32_P57810	RNF157	0.3329	0.0020	0.0261
A_24_P11575	CRIM1	0.3190	0.0032	0.0334
A_32_P231086	GOLGA6L9	0.2961	0.0007	0.0185
A_33_P3337569	PRR27	0.4121	0.0162	0.0489
A_23_P22761	SHOX	0.4656	0.0136	0.0466
A_33_P3212188	LRP3	0.3826	0.0106	0.0431
A_23_P360990	DYDC1	0.2755	0.0008	0.0188
A_33_P3344690	PTGER4P2- CDK2AP2P2	0.3146	0.0052	0.0379
A_33_P3548190	LINC00347	0.4185	0.0166	0.0496
A_33_P3227842	EPB41	0.4498	0.0074	0.0391
A_23_P388124	ABCD2	0.4283	0.0121	0.0455
A_23_P42588	GIMAP5	0.4073	6.86E+09	0.0052
A_33_P3839897	RNU4ATAC	0.4883	0.0105	0.0431
A_33_P3383044	B9D1	0.4268	0.0144	0.0470
A_24_P358054	CTAGE10P	0.3231	0.0006	0.0167
A_33_P3259373	PWAR1	0.4143	0.0142	0.0468
A_33_P3413671	ABL2	0.2834	0.0008	0.0185
A_33_P3311493	TRHDE-AS1	0.3932	0.0018	0.0259
A_23_P2322	TSPAN19	0.3159	0.0021	0.0266

A_21_P0013552	XLOC_l2_014697	0.2845	7.97E+09	0.0054
A_21_P0000117	MID1	0.4333	0.0150	0.0478
A_33_P3285132	ZNF599	0.3649	0.0079	0.0395
A_21_P0000558	BRE-AS1	0.3975	0.0051	0.0379
A_33_P3260146	C9orf3	0.3746	0.0038	0.0344
A_24_P43144	PDE11A	0.4737	0.0082	0.0398
A_33_P3215676	MANSC4	0.4960	0.0127	0.0457
A_33_P3467872	LINC00343	0.4363	0.0077	0.0393
A_19_P00321316	LINC00882	0.4631	0.0044	0.0361
A_33_P3336484	NPIPA5	0.3706	0.0080	0.0395
A_33_P3405168	MMAA	0.4296	0.0051	0.0379
A_23_P154784	BPIFB1	0.3620	0.0002	0.0094
A_33_P3393200	SRRM4	0.4686	0.0117	0.0455
A_33_P3387493	FTH1P18	0.3136	0.0002	0.0092
A_33_P3861634	LINC01305	0.4990	0.0101	0.0427
A_21_P0010488	ZNF605	0.4103	0.0051	0.0379
A_33_P3225535	OR10K2	0.4387	0.0115	0.0449
A_23_P31064	MOXD1	0.3839	0.0070	0.0389
A_33_P3375506	LINC01203	0.4358	3.48E+08	0.0016
A_33_P3246268	HOXD13	0.2687	0.0056	0.0379
A_33_P3255384	BPIFC	0.4614	0.0080	0.0395
A_33_P3383601	QRFP	0.4463	0.0038	0.0344
A_33_P3267989	CLNK	0.4025	0.0070	0.0389
A_32_P95960	CLEC2D	0.4298	0.0106	0.0431
A_23_P390148	RALGPS1	227.472.113.221.315	0.0059	0.0381
A_21_P0004143	LINC01335	0.4390	0.0090	0.0406
A_33_P3299066	NR4A2	0.4775	0.0137	0.0466
A_33_P3309911	PRAMEF5	0.4454	0.0103	0.0429
A_23_P218675	WFDC2	0.4787	0.0130	0.0464
A_33_P3347528	CHIAP2	0.4209	0.0001	0.0065
A_23_P212042	MFI2	0.3179	0.0029	0.0324
A_33_P3401556	CTLA4	0.4276	4.86E+08	0.0016

A_23_P217507	ZBED1	257.948.904.602.257	0.0096	0.0415
A_33_P3286536	FUT4	0.4820	0.0161	0.0489
A_33_P3408420	MDGA2	0.3470	0.0072	0.0389
A_23_P94762	ZNF354B	0.4901	0.0031	0.0331
A_23_P156824	HTR1B	239.937.085.039.903	0.0057	0.0379
A_23_P32577	DACH1	233.736.545.984.496	0.0061	0.0381
A_23_P419107	TCP11L2	232.350.395.892.368	0.0162	0.0489
A_24_P8075	KLHDC4	227.531.196.835.458	0.0089	0.0406
A_21_P0011389	XLOC_12_005076	241.849.854.526.815	0.0060	0.0381
A_24_P89971	SURF4	209.000.357.924.191	0.0037	0.0344
A_33_P3327300	NUMBL	0.4328	9.75E+09	0.0063
A_33_P3263906	TUBE1	0.4903	0.0021	0.0266
A_24_P182892	SLC19A3	0.4390	0.0070	0.0389
A_24_P353905	MXRA8	0.3213	0.0144	0.0470
A_33_P3305243	PSMD5	0.4218	570019345.0720	0.0016
A_23_P84047	PABPC5	0.2679	0.0135	0.0466
A_21_P0007062	LINC00844	0.3525	0.0151	0.0478
A_33_P3793707	LINC00964	0.3792	0.0157	0.0488
A_32_P78681	GLP2R	0.4668	0.0084	0.0398
A_21_P0013210	XLOC_12_013436	0.4251	0.0023	0.0273
A_23_P373724	PPFIBP1	0.3587	0.0042	0.0361
A_19_P00808461	ZNF37A	0.4825	0.0113	0.0444
A_21_P0010870	FAM21C	0.4970	0.0132	0.0465
A_23_P329261	KCNJ2	0.4844	6.58E+07	0.0016
A_24_P165205	MORN1	0.4445	0.0005	0.0162
A_33_P3299435	SART1	0.4873	0.0100	0.0423
A_23_P132826	SERPINI2	0.4693	0.0002	0.0079
A_33_P3374478	CASC4	0.4620	0.0002	0.0079
A_32_P485915	SLC9C2	0.4565	3.38E+09	0.0032
A_33_P3396886	C11orf52	0.4715	0.0119	0.0455
A_33_P3376379	CNST	0.4698	0.0033	0.0339
A_24_P378987	DHRX	242.898.673.793.384	0.0069	0.0389

A_23_P148629	EIF1AY	200.273.907.748.429	0.0008	0.0185
A_24_P287189	TOLLIP	0.4632	0.0094	0.0411
A_33_P3422777	PRH2	0.4075	0.0023	0.0273
A_23_P904	BEND5	0.3056	1.49E+09	0.0027
A_32_P100258	FLJ37453	261.439.515.682.183	0.0149	0.0478
A_24_P408704	DOCK2	0.3989	0.0037	0.0344
A_33_P3263867	P2RX7	0.4894	0.0075	0.0391
A_33_P3556532	DNAH17	0.4725	0.0148	0.0477
A_32_P96000	ETV3L	0.4919	0.0076	0.0391
A_24_P940135	CTBS	0.4883	0.0083	0.0398
A_23_P329353	CNRIP1	562.111.664.539.578	0.0141	0.0466
A_23_P4714	MIA	25.557.836.842.375	0.0072	0.0389
A_23_P363778	FRZB	0.3747	0.0059	0.0381
A_33_P3336622	ALDH3A2	0.4271	0.0043	0.0361
A_32_P183218	ZNF367	0.4598	0.0100	0.0423
A_21_P0010980	MALAT1	0.4995	0.0159	0.0488
A_21_P0011744	LINC00665	0.4015	0.0062	0.0382
A_21_P0004602	OSTM1-AS1	0.4881	0.0011	0.0213
A_23_P58538	EPB41L4A-AS1	0.4450	3.34E+09	0.0032
A_32_P171181	NBPF10	0.4671	0.0065	0.0388
A_33_P3320772	ATXN1	241.262.550.757.345	0.0084	0.0398
A_33_P3415551	GPAT2	0.3903	0.0005	0.0162
A_21_P0000702	STX18-AS1	0.4048	0.0004	0.0136
A_21_P0011825	XLOC_12_007449	0.3220	0.0013	0.0235
A_21_P0013633	XLOC_12_015174	0.4479	0.0103	0.0429
A_32_P4018	ROR1	209.471.242.431.168	0.0043	0.0361
A_19_P00320274	ZMIZ1-AS1	247.147.261.007.869	0.0039	0.0344
A_23_P35883	FOXRED1	225.117.526.651.875	0.0020	0.0262
A_19_P00802872	XIST	31.994.851.869.667	0.0157	0.0488
A_24_P58501	OR4F4	0.4951	0.0091	0.0406
A_19_P00321129	TSIX	320.070.484.723.775	0.0023	0.0277
A_33_P3369401	CYP24A1	228.002.503.108.971	0.0073	0.0389

A_24_P203106	PFKFB1	239.308.418.243.043	0.0033	0.0339
A_24_P105391	ERMAP	222.428.151.416.224	0.0061	0.0381
A_33_P3404316	MIR100HG	0.4148	0.0150	0.0478
A_24_P307580	HTATIP2	0.2971	5.65E+08	0.0016
A_23_P401700	APBB1IP	221.062.196.465.168	0.0058	0.0381
A_33_P3254082	SPATA6L	0.4469	0.0088	0.0406
A_23_P422245	KIAA0825	0.4245	0.0068	0.0389
A_21_P0013192	7/set	0.3977	0.0119	0.0455
A_23_P214533	ZSCAN31	210.944.376.103.009	0.0117	0.0455
A_33_P3221648	XLOC_12_010328	0.3856	0.0166	0.0496
A_33_P3216232	ITGB1BP1	201.975.833.333.702	0.0109	0.0433
A_23_P141802	SERPINB7	0.4387	0.0040	0.0352
A_33_P3332018	FGL2	0.4741	0.0056	0.0379
A_33_P3213508	C7orf72	0.4364	0.0090	0.0406
A_23_P356494	SPINK5	0.4280	0.0119	0.0455
A_23_P170186	OPLAH	0.4671	0.0031	0.0330
A_33_P3380867	STAT5B	263.605.790.194.262	0.0039	0.0344
A_24_P136029	SLC12A1	0.3525	0.0054	0.0379
A_21_P0013560	XLOC_12_014757	226.353.903.304.204	0.0110	0.0435
A_23_P149858	ELOVL3	546.951.058.273.017	0.0107	0.0431
A_21_P0005159	LINC00581	0.3758	0.0037	0.0344
A_19_P00318183	LINC01197	0.3818	0.0044	0.0361
A_32_P221958	AGAP9	0.4735	0.0076	0.0391
A_23_P217704	GYG2	222.806.714.133.915	0.0056	0.0379
A_33_P3482417	ANKRD26P3	0.4621	2.89E+09	0.0032
A_24_P225635	HNRNPLL	0.3815	0.0023	0.0273
A_23_P252471	PECAM1	0.4664	0.0149	0.0478
A_24_P282416	ABL1	0.4531	0.0145	0.0470
A_33_P3383326	LPAR1	0.4802	0.0159	0.0488
A_23_P142075	ACP5	0.4037	0.0007	0.0185
A_33_P3391039	PRR27	0.3662	0.0133	0.0466
A_19_P00317168	XLOC_12_002160	0.4815	0.0132	0.0466

A_21_P0011299	XLOC_12_004595	0.4874	0.0151	0.0478
A_24_P192988	CCDC89	0.3456	0.0093	0.0410
A_23_P502081	MAGEC3	0.4331	0.0123	0.0455
A_23_P128974	BATF	0.4931	0.0123	0.0455
A_19_P00321148	LINC01127	0.4417	0.0088	0.0406
A_33_P3380457	GPR88	0.4516	0.0095	0.0415
A_24_P218006	DNAJC30	0.3820	0.0085	0.0401
A_32_P163247	CD8A	0.4407	0.0011	0.0210
A_24_P355267	SLC25A25	0.4431	0.0147	0.0477
A_21_P0002781	LINC01213	0.3793	0.0043	0.0361
A_24_P324368	DNAJC14	0.4240	0.0103	0.0429
A_23_P329835	UTY	0.4832	0.0158	0.0488
A_21_P0000545	OR5E1P	0.3217	0.0044	0.0361
A_21_P0001612	LINC00303	0.4302	0.0040	0.0350
A_19_P00318370	LINC00883	0.4883	0.0048	0.0370
A_23_P7901	TTLL2	0.3387	0.0094	0.0411
A_32_P140489	GDF6	0.4679	0.0006	0.0167
A_21_P0013896	TTY14	0.4533	0.0075	0.0391
A_21_P0009555	SMAD2	0.4626	0.0138	0.0466
A_24_P214552	LINC01565	0.4366	0.0061	0.0381
A_24_P176079	WASF3	0.4537	0.0008	0.0185
A_24_P111406	CFHR5	0.4664	0.0061	0.0381
A_33_P3241388	SLC4A5	0.4290	0.0140	0.0466
A_21_P0000614	LINC00254	0.3837	0.0037	0.0344
A_33_P3276653	SPANXN1	0.4538	3.00E+09	0.0032
A_32_P212095	C17orf105	0.3412	0.0096	0.0415
A_23_P63521	LCE2C	0.4621	0.0002	0.0092
A_23_P132341	C22orf46	0.4358	0.0081	0.0396
A_23_P364324	ABCA13	0.3581	0.0017	0.0259
A_23_P57658	HRASLS	0.3726	0.0100	0.0423
A_21_P0012471	XLOC_12_010451	0.4752	0.0123	0.0455
A_33_P3249489	WDR89	0.3448	0.0029	0.0324

A_33_P3319870	GREM1	0.3785	0.0095	0.0413
A_21_P0012424	XLOC_12_010056	0.4935	0.0127	0.0457
A_24_P176493	ATMIN	0.4982	0.0077	0.0393
A_23_P257111	FBP1	0.4487	0.0139	0.0466
A_32_P46214	SLC9A9	0.4617	0.0054	0.0379
A_23_P145376	MAPK13	0.3207	0.0003	0.0106
A_33_P3323904	WTH3DI	0.3614	0.0124	0.0455
A_24_P38081	FKBP5	0.4297	0.0151	0.0478
A_21_P0013742	LINC01509	0.3400	0.0069	0.0389
A_23_P161940	SCGB2A2	0.3922	0.0059	0.0381
A_21_P0006771	ZNF503	0.4531	0.0049	0.0372
A_21_P0013029	XLOC_12_012614	0.4506	0.0073	0.0389
A_21_P0012764	LINC01262	0.4163	0.0070	0.0389
A_24_P12059	GYPA	0.4426	0.0063	0.0382
A_21_P0013164	LPAL2	0.4825	0.0038	0.0344
A_33_P3408152	NEFH	0.4982	0.0046	0.0368
A_21_P0011571	XLOC_12_006003	0.4365	0.0083	0.0398
A_33_P3281308	FIRRE	0.4802	0.0044	0.0361
A_23_P311010	SPRY3	0.4689	0.0124	0.0455
A_33_P3306307	KRT26	0.4371	0.0140	0.0466
A_33_P3334679	SNCAIP	0.3970	0.0159	0.0488
A_33_P3367247	CNTLN	0.4596	0.0126	0.0457
A_23_P46584	C1orf105	0.4630	0.0022	0.0266
A_23_P37410	CYP19A1	0.4975	0.0137	0.0466
A_21_P0006456	XIST	245.683.205.873.009	0.0107	0.0431
A_33_P3235531	CD1D	0.3872	0.0019	0.0261
A_21_P0000043	KRTAP21-3	0.4999	0.0004	0.0128
A_24_P153831	CTNNA3	0.3771	0.0068	0.0389
A_33_P3354607	CCL4L2	326.462.786.883.446	0.0086	0.0401
A_24_P124988	GOLGA6A	0.4383	0.0140	0.0466
A_23_P163227	CKMT1A	0.3685	0.0093	0.0411
A_21_P0013561	XLOC_12_014757	0.4287	0.0127	0.0457

A_33_P3274691	SCART1	0.4215	0.0123	0.0455
A_21_P0010549	XLOC_12_000384	0.4466	0.0064	0.0385
A_33_P3232498	C2orf71	0.4339	0.0048	0.0370
A_33_P3280317	C1orf137	0.4534	0.0012	0.0213
A_32_P152767	SKIDA1	218.191.970.012.065	0.0136	0.0466
A_33_P3285420	LINC01020	0.4724	0.0083	0.0398
A_19_P00324839	MALAT1	0.4644	0.0048	0.0370
A_24_P274795	CDCA7L	0.4789	0.0014	0.0239
A_33_P3284108	NSF	0.4088	0.0117	0.0455
A_23_P397208	GSTM2	0.4712	0.0015	0.0246
A_24_P319942	SSR3	20.004.869.951.758	0.0106	0.0431
A_33_P3389649	PDE4D	0.3525	0.0161	0.0489
A_23_P94782	CAPN8	209.979.600.208.782	0.0071	0.0389
A_33_P3736691	ZNF430	234.278.480.913.037	0.0090	0.0406
A_23_P162300	IRAK3	251.309.135.760.067	0.0019	0.0261
A_33_P3391905	SMEK3P	0.4882	0.0127	0.0457
A_33_P3851023	NRXN3	0.4731	0.0054	0.0379
A_23_P373541	DSPP	0.4296	0.0016	0.0255
A_23_P15678	TEKT1	0.4975	0.0073	0.0389
A_23_P114585	PCNXL2	0.3763	0.0006	0.0167
A_23_P13102	CASP12	285.961.311.304.283	0.0057	0.0380
A_19_P00316324	LINC01132	329.589.428.688.704	0.0024	0.0278
A_33_P3417950	AKAP8	208.300.268.063.925	0.0121	0.0455
A_24_P133162	STPG1	21.435.761.924.329	0.0018	0.0261
A_33_P3260445	DYNLT1	0.3427	0.0084	0.0398
A_24_P285501	UBR3	244.140.845.915.473	0.0119	0.0455
A_33_P3215043	HEPHL1	0.4947	0.0074	0.0390
A_23_P217384	AP1S2	0.4893	0.0040	0.0353
A_33_P3341601	WDR86	396.843.744.975.867	0.0141	0.0466
A_33_P3280405	OR7E37P	0.4439	0.0139	0.0466
A_21_P0011611	DNAH17	0.4613	0.0150	0.0478
A_33_P3243069	KIAA0040	0.3351	0.0076	0.0391

Tabela Suplementar 5: Enriquecimento de vias de genes expressos diferencialmente (DE).

GOBPID	p Value	Count	Size	Process	Genes
GO:0086004	0.0036	3	35	Regulation of cardiac muscle cell contraction	<i>KCNJ2, CTNNA3, PDE4D</i>
GO:0006942	0.0069	4	85	Regulation of striated muscle contraction	<i>KCNJ2, CTNNA3, GSTM2, PDE4D</i>
GO:0055119	0.0004	3	17	Relaxation of cardiac muscle	<i>KCNJ2, GSTM2, PDE4D</i>
GO:0014861	0.0089	1	1	Regulation of skeletal muscle contraction via regulation of action potential	<i>KCNJ2</i>
GO:1904531	0.0089	1	1	Positive regulation of actin filament binding	<i>ABL1</i>
GO:0051283	0.0134	4	103	Negative regulation of sequestering of calcium ion	<i>P2RX7, ABL1, GSTM2, PDE4D</i>
GO:0097553	0.0162	4	109	Calcium ion transmembrane import into cytosol	<i>P2RX7, ABL1, GSTM2, PDE4D</i>
GO:0090076	0.0177	1	2	Relaxation of skeletal muscle	<i>KCNJ2</i>
GO:1904616	0.0177	1	2	Regulation of actin binding	<i>ABL1</i>
GO:1905330	0.0218	5	179	Regulation of morphogenesis of an epithelium	<i>HOXD13, PSMD5, ROR1, ABL1, GREM1</i>
GO:0060048	0.0247	4	124	Cardiac muscle contraction	<i>KCNJ2, CTNNA3, GSTM2, PDE4D</i>
GO:0032485	0.0264	1	3	Regulation of Ral protein signal transduction	<i>RALGPS1</i>
GO:0070315	0.0264	1	3	G1 to G0 transition involved in cell differentiation	<i>ZNF503</i>
GO:0071673	0.0264	1	3	Positive regulation of smooth muscle cell chemotaxis	<i>LPAR1</i>
GO:0090135	0.0264	1	3	Actin filament branching	<i>ABL1</i>
GO:0032970	0.0265	7	326	Regulation of actin filament-based process	<i>ABL2, KCNJ2, ITGB1BP1, ABL1, LPAR1, CTNNA3, PDE4D</i>
GO:0030855	0.0268	12	720	Epithelial cell differentiation	<i>B9D1, TOLLIP, FRZB, SPINK5, STAT5B, ABL1, SLC4A5, LCE2C,</i>

					<i>GREM1, KRT26, KRTAP21-3, PDE4D</i>
GO:0014808	0.0272	2	29	Release of sequestered calcium ion into cytosol by sarcoplasmic reticulum	<i>GSTM2, PDE4D</i>
GO:0002042	0.0345	2	33	Cell migration involved in sprouting angiogenesis	<i>ITGB1BP1, GREM1</i>
GO:2000249	0.0345	2	33	Regulation of actin cytoskeleton reorganization	<i>ABL2, ABL1</i>
GO:0003257	0.0350	1	4	Posit. reg. of transcr. from RNA polIII promoter involved in myocardial precursor cell diff.	<i>GREM1</i>
GO:0006933	0.0350	1	4	Negative regulation of cell adhesion involved in substrate-bound cell migration	<i>ITGB1BP1</i>
GO:0014809	0.0350	1	4	Regulation of skeletal muscle contraction by regulation of release of sequestered calcium ion	<i>GSTM2</i>
GO:0060244	0.0350	1	4	Negative regulation of cell proliferation involved in contact inhibition	<i>DACH1</i>
GO:0060401	0.0354	4	139	Cytosolic calcium ion transport	<i>P2RX7, ABL1, GSTM2, PDE4D</i>
GO:0051281	0.0405	2	36	Positive regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol	<i>ABL1, GSTM2</i>
GO:0003009	0.0426	2	37	Skeletal muscle contraction	<i>KCNJ2, GSTM2</i>
GO:0050850	0.0447	2	38	Positive regulation of calcium-mediated signaling	<i>CD8A, GSTM2</i>
GO:0030098	0.0020	9	316	Lymphocyte differentiation	<i>CTLA4, SART1, DOCK2, SPINK5, STAT5B, ABL1, BATF, CD8A, CD1D</i>
GO:0009791	0.0448	3	89	Post-embryonic development	<i>NR4A2, ABL1, SMAD2</i>
GO:0010001	0.0223	5	180	Glial cell differentiation	<i>MXRA8, ROR1, ABL1, LPAR1, WASF3</i>

Basic Study

Piwi like RNA-mediated gene silencing 1 gene as a possible major player in gastric cancer

Taíssa Araújo, André Khayat, Luciana Quintana, Danielle Calcagno, Ronald Mourão, Antônio Modesto, Juliana Paiva, Adhara Lima, Fabiano Moreira, Edivaldo Oliveira, Michel Souza, Moneeb Othman, Thomas Liehr, Eliana Abdelhay, Renata Gomes, Sidney Santos, Paulo Assumpção

Taíssa Araújo, André Khayat, Luciana Quintana, Danielle Calcagno, Ronald Mourão, Antônio Modesto, Juliana Paiva, Adhara Lima, Fabiano Moreira, Sidney Santos, Paulo Assumpção, Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém 66073-000, Brazil

Edivaldo Oliveira, Michel Souza, Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, Instituto Evandro Chagas, Belém 66087-082, Brazil

Moneeb Othman, Thomas Liehr, Institute of Human Genetics, Universitätsklinikum Jena, Jena 07747, Germany

Eliana Abdelhay, Renata Gomes, Laboratório de Célula Tronco, Centro de Transplante de Medula Óssea, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro 20230-130, Brazil

ORCID number: Taíssa Araújo (0000-0002-1716-4445); André Khayat (000-0002-3451-6369); Luciana Quintana (0000-0003-3261-910X); Danielle Calcagno (0000-0002-4429-2573); Ronald Mourão (0000-0001-5582-4961); Antônio Modesto (0000-0003-1854-0358); Juliana Paiva (0000-0002-2082-2250); Adhara Lima (0000-0001-6315-2392); Fabiano Moreira (0000-0002-2799-3546); Edivaldo Oliveira (0000-0001-6315-3352); Michel Souza (0000-0003-1038-6448); Moneeb Othman (0000-0002-0743-1191); Thomas Liehr (0000-0003-1672-3054); Eliana Abdelhay (0000-0001-5166-0832); Renata Gomes (0000-0001-7590-0335); Sidney Santos (0000-0002-8622-9417); Paulo Assumpção (0000-0003-3846-8445).

Author contributions: Araújo T and Khayat A contributed equally to this work; Araújo T and Khayat A performed the majority of experiments; Moreira F, Oliveira E and Souza M analyzed the data; Modesto A, Paiva J and Lima A performed the molecular investigations; Quintana L, Calcagno D and Mourão R participated equally in cell culture management; Othman M and Liehr T performed molecular cytogenetics experiments; Abdelhay E and Gomes R performed proteomic assay; Santos S and Assumpção P designed and coordinated the research; Araújo T, Khayat A and Quintana L wrote the paper.

Supported by Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa (FAPESPA), No. 174/2014.

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

Data sharing statement: No additional data are available.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Unsolicited manuscript

Corresponding author to: Paulo Assumpção, MD, MSc, PhD, Academic Research, Adjunct Professor, Surgical Oncologist, Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Rua dos Mundurucus 4487, Belém 66073-000, Brazil. assumpcaopp@gmail.com
Telephone: +55-91-984171112

Received: August 14, 2018

Peer-review started: August 14, 2018

First decision: August 31, 2018

Revised: September 7, 2018

Accepted: October 5, 2018

Article in press: October 5, 2018

Published online: December 21, 2018

Abstract**AIM**

To establish a permanent *piwi like RNA-mediated gene*

silencing 1 (PIWIL1) gene knockout in AGP01 gastric cancer cell line using CRISPR-Cas9 system and analyze phenotypic modifications as well as gene expression alterations.

METHODS

CRISPR-Cas9 system used was purchased from Dharmacon GE Life Sciences (Lafayette, CO, United States) and permanent knockout was performed according to manufacturer's recommendations. Wound-healing assay was performed to investigate the effect of *PIWIL1* knockout on migration capability of cells and Boyden chamber invasion assay was performed to investigate the effect on invasion capability. For the gene expression analysis, a one-color microarray-based gene expression analysis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) was used according to the protocol provided by the manufacturer.

RESULTS

PIWIL1 gene knockout caused a significant decrease in AGP01 migration capacity as well as a significant decrease in cell invasiveness. Moreover, functional analysis based on grouping of all differentially expressed mRNAs identified a total of 35 genes (5 up-regulated and 30 down-regulated) encoding proteins involved in cellular invasion and migration. According to current literature, 9 of these 35 genes (*DOCK2*, *ZNF503*, *PDE4D*, *ABL1*, *ABL2*, *LPAR1*, *SMAD2*, *WASF3* and *DACH1*) are possibly related to the mechanisms used by *PIWIL1* to promote carcinogenic effects related to migration and invasion, since their functions are consistent with the changes observed (being up- or down-regulated after knockout).

CONCLUSION

Taken together, these data reinforce the idea that *PIWIL1* plays a crucial role in the signaling pathway of gastric cancer, regulating several genes involved in migration and invasion processes; therefore, its use as a therapeutic target may generate promising results in the treatment of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; *Piwi like RNA-mediated gene silencing 1*; CRISPR-Cas9; Migration; Invasion

© The Author(s) 2018. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: *Piwi like RNA-mediated gene silencing 1 (PIWIL1)* gene emerged as an interesting target for gastric cancer, as it is expressed in cancer, stem and germ cells, but it is absent in normal somatic tissue. Our results propose that *PIWIL1* plays a crucial role in the signaling pathway of gastric cancer, regulating several genes involved in migration and invasion processes; therefore, its use as a therapeutic target may generate promising results in the treatment of gastric cancer.

Araújo T, Khayat A, Quintana L, Calcagno D, Mourão R, Modesto A, Paiva J, Lima A, Moreira F, Oliveira E, Souza M, Othman M,

Liehr T, Abdelhay E, Gomes R, Santos S, Assumpção P. *Piwi like RNA-mediated gene silencing 1* gene as a possible major player in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2018; 24(47): 5338-5350
URL: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v24/i47/5338.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.3748/wjg.v24.i47.5338>

INTRODUCTION

Gastric cancer is a major contributor to global cancer burden, being the third leading cause of cancer death worldwide and in both sexes^[1]. This type of cancer is thought to be consequence of a multi-step process, resulting from different genetic and epigenetic changes. Specifically, dysfunction of oncogenes and tumor suppressor genes contributes to this malignant disease, and many candidate genes have been implicated to serve as gastric cancer biomarkers^[2].

In this context, the *piwi like RNA-mediated gene silencing 1 (PIWIL1)* gene, located in 12q24.33 and having 22 exons, became an attractive target for gastric cancer treatment. *PIWIL1* protein is expressed at increased levels in cancer tissues, stem cells and germ cells, but it has been shown to be absent in normal somatic tissues. This means that it could be a potential target for therapy, since most non-cancer cells would not be affected by cytotoxic effects^[3-7].

PIWIL1 plays a key role in tumor cell viability, migration and invasion, and its expression is associated with the maintenance of stem-like characteristics of tumors, which in turn contribute to more severe histological grade, advanced stage and worse clinical outcome^[8-10].

Wang *et al.*^[11] showed that expression of *PIWIL1* in gastric cancer tissue was significantly higher than in adjacent-to-tumor tissue (tumor front). They also demonstrated that patients with a lower expression of *PIWIL1* presented a significant better overall survival rate compared to patients with a higher expression levels. Additionally, the 5-year survival rate of patients with a higher expression level of *PIWIL1* was significantly lower (36.5% vs 67.6%).

Liu *et al.*^[12] reported that expression of *PIWIL1* progressively increases during cancer development. The expression ratio in normal gastric tissues, atrophic gastritis, intestinal metaplasia and gastric cancers varied from 10% to 76%.

To further investigate the potential functions of the *PIWIL1* gene, Liu *et al.*^[12] also silenced *PIWIL1* by antisense or short hairpin RNA and noted that suppression of this gene inhibited the growth of gastric cancer cells and induced G2/M arrest. Although relevant information regarding the possible role of *PIWIL1* in gastric cancer carcinogenesis is provided by the current literature, the exact molecular mechanisms involved in this carcinogenic process remain unclear.

A recently introduced technology, based on the adaptive immune system of prokaryotes and known as type II clustered, regularly interspaced, short palindromic

repeats (CRISPR)/associated protein (Cas), has been demonstrated to cleave double-stranded DNA and has emerged as a relevant genome editing tool^[13-15].

This technology can be used both to perform permanent gene knockouts and the site-specific integration of a gene (knock-in)^[16-19]. Importantly, it allows for the permanent silencing of the target gene, and it also creates a stable and permanent cell line with the desired modification^[14,16].

Here we applied CRISPR/Cas9 technology for the first time to knockout *PIWIL1* gene in a gastric cancer cell line and analyzed its phenotypic modifications.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

The human gastric cancer cell line AGP01 was maintained in DMEM-F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The cell culture grew attached to a plastic flask in a monolayer in a humidified incubator maintained at 37 °C and 5% CO₂.

The AGP01 cell line was established by our research group in 2009^[20] from cancer cells present in the ascitic fluid of a female individual with intestinal gastric cancer, located at the antrum and the body region of the stomach, and staged as T3N2M1. The cell line was tested and authenticated by conventional cytogenetics^[20]. Recently, the AGP01 cell line was tested by multicolor-fluorescence *in situ* hybridization (FISH), and results are presented here.

24-color-FISH using all human whole chromosome painting probes

24-color-FISH using simultaneous all human whole chromosome painting (WCP) probes was done as previously reported^[21,22]. A total of 20 metaphases was analyzed, using a fluorescence microscope (Axio Imager Z1 mot; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) equipped with appropriate filter sets to discriminate between a maximum of five fluorochromes and the counterstain DAPI; the latter was used to induce a GTG-like banding pattern. Image capturing and processing were carried out using ISIS imaging system (MetaSystems, Altlußheim, Germany).

Targeted knockout of *PIWIL1* using the CRISPR-Cas9 system

The CRISPR-Cas9 system used was purchased from Dharmacon GE Life Sciences (Lafayette, CO, United States). First, 1×10^4 AGP01 cells/well were seeded in DMEM-F12 medium to a 96-well plate for 24 h. Subsequently, transfection was performed using CR-0046-03-005 (Dharmacon GE Life Sciences) for 48 h. For the transfection procedure, a solution containing 1 µL of the CRISPR RNAs (crRNAs) mixed with the trans-activating small RNA, 2 µL of Cas9 and 7 µL of DMEM-F12 medium (for each well) was prepared first. In another tube, 0.4 µL of DharmaftecDUO and 9.6 µL of DMEM-F12 medium (to each well) were added.

The solutions were then incubated for 5 min at room temperature before being combined. After combining, the solution was incubated for 20 min at room temperature, and finally 80 µL of DMEM-F12 medium/10% fetal calf serum (FCS) (per well) was added. At the end of the transfection, all contents (from each well) were transferred to a 24-well plate containing DMEM-F12 medium/10% FCS/1% pen-strep.

After 24 h, samples were treated with 6 µg/mL of puromycin for 72 h to select the resistant clones. Next, 40 cells were plated per well in a 6-well plate to isolate the clones by the filter paper method.

This method consists of using a cut and autoclaved piece of filter paper so that it, after being soaked in trypsin, can be positioned above a single colony of cells that has grown from an isolated cell, allowing for the collection of this clone. Subsequently, each clone grew in a separate well in a 6-well plate, so it could reach the confluence needed to perform DNA extraction and sequencing.

Sequencing

DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, United States) according to the manufacturer's instructions. For PCR, specific primers targeting the binding region of the purchased crRNA were constructed using the online program Primer3 (Supplementary Table 1).

The quantities of the reagents used in the PCR for a final volume of 12 µL were as follows: 6.25 µL of nuclease-free H₂O, 0.5 µL of forward primer (10 ng/µL), 0.5 µL of reverse primer (ng/µL), 4.25 µL of GoTaq Colorless Master Mix 2× (Promega Corporation) and 1 µL of DNA (10 ng/µL).

The conditions using the MasterCycler Gradient thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) were 1 cycle at 95 °C for 3 min for initial denaturation followed by 35 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 2 min, primer annealing at 59 °C for 1 min and extension at 70 °C for 2 min, ending with 1 cycle at 70 °C for a final extension for 30 min.

For direct sequencing of the PCR product, the quantities of the reagents used for a final volume of 20 µL were as follows: 15 µL of nuclease-free water, 0.5 µL of forward or reverse primer (10 ng/µL), 0.5 µL of Big Dye, 3 µL of Save Money and 1 µL of the PCR reaction. For this reaction, the ABI PRISM Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Hercules, CA, United States) was used.

The sequencing was performed using the MasterCycler Gradient (Eppendorf) thermal cycler according to the following 25-cycle thermocycling conditions: denaturation at 96 °C for 50 s, primer annealing at 59 °C for 1 min and extension at 60 °C for 4 min, ending with 1 cycle at 4 °C for 5 min.

After this procedure, a precipitation step was carried out in order to purify the product of the reaction before continuing. For this step, samples were washed with

70% isopropanol and 70% ethanol. Subsequently, sequencing was performed using the ABI Prism 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems). The methodology used was based on the biochemical synthesis of the DNA strand by the Sanger method.

Sequencing analysis

Reference sequence for exon 15 in the *PIWIL1* gene was obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and compared with the DNA sequence of the modified cell line as well as the negative control (cell line without the gene knockout). To infer the effect of changes in protein synthesis, we applied Gene Runner v.3.05 (Hastings Software Inc., Hastings, NY, United States; <http://www.generunner.com>).

Wound-healing assay

Cells were grown in 12-well plates at a density of 2×10^5 cells/well and maintained for 24 h in 5% CO₂ at 37 °C. After this period, cells were injured with a 10 µL tip in the center of each well. The medium was then removed to eliminate suspended cells, and wells were washed with 1 × phosphate buffered saline before fresh DMEM-F12 medium/10% FCS/1% pen-strep was added again.

The behavior of cells was observed and photographed immediately after injury and at 6 h, 12 h and 24 h after injury. All experiments were performed in triplicate.

Boyden chamber invasion assay

Boyden inserts (8 µm pores) (BD Biosciences™, Franklin Lakes, NJ, United States) were coated with 200 µL of Matrigel (10-13 mg/mL) in 12-well plates. Cells (2×10^5) were seeded in the upper chamber in 1 mL of DMEM without fetal bovine serum. In the lower chamber, DMEM-F12 medium/10% FCS/1% pen-strep was added, functioning as a chemoattractant for the cells present in the upper chamber.

After 48 h, the remaining cells above the filter were removed by scraping with a sterile swab. The cells at the bottom of the filter were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Giemsa. Cells were photographed and analyzed using a light microscope and counted in optical fields (100 ×). All experiments were performed in triplicate.

Total RNA extraction

The mRNA extraction was performed using Promega's Total RNA Isolation System kit, according to the manufacturer's specifications. AGP01 and AGP01 *PIWIL1* knockout cells were prepared for mRNA extraction. Samples were lysed with lysis buffer containing beta-mercaptoethanol and then diluted in RNA dilution buffer. The samples were centrifuged for 10 min at maximum speed. Then, 95% ethanol was added to ensure adequate membrane binding conditions.

The samples were then transferred to centrifuge

columns where the RNA could bind the membrane of the column, facilitating washing to eliminate possible contaminants as well as favoring the extraction of high quality of total RNA.

At the end of the procedure, the RNA was diluted in 60 µL of nuclease-free water. The total RNA was quantified using a Nanodrop spectrophotometer ND-1000 UV-VIS version 3.2.1 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, United States). The RNA quality was also evaluated by analyzing the A₂₆₀/A₂₈₀ ratio according to the manufacturer's specifications. Purified RNA was stored at -80 °C for the microarray expression assay.

Microarray expression

For the microarray assay, a one-color microarray-based gene expression analysis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) was used according to the protocol provided by the manufacturer. The gene expression profile was evaluated in both cell lines (AGP01 with and without *PIWIL1* knockout).

The total RNA obtained during the extraction phase was used as the template for the synthesis of the first cDNA strand by reverse transcription using T7 RNA polymerase. Synthesis of the second cDNA strand was used as the template for the *in vitro* transcription reaction for cRNA production. The cRNA was then incorporated into the fluorochrome 3-cyanine (Cy-3) using the Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent Technologies) according to the protocol provided by the manufacturer. Thereafter, the cRNA purification process was carried out.

The cRNA was quantified by a spectrophotometer (pmol/L), by which it was possible to analyze the absorbance ratio (260 nm/280 nm) and the cRNA (ng/µL) concentration in each sample. After, hybridization was performed for 17 h in a hybridization chamber at 65 °C at 10 rpm. After this period, the slide was washed and immediately scanned in the Agilent G4900DA SureScan Microarray System.

The following setup was used to scan the microarray slides for one color: scan region of 61 mm × 21.6 mm, 5 µm scan resolution, dye channel of green. Next, the images were obtained by using Feature Extraction v10.10 software, and the data were analyzed with GeneSpring GX 9.0 and IPathwayguide (Advaita Bioinformatics Company, Plymouth, MI, United States) programs. Gene identification followed a restriction criterion with a fold-change of > 2.

Differential expression and gene ontology enrichment analysis

To identify differentially expressed (DE) mRNAs, we compared the probes' expression profiles before and after *PIWIL1* knockout. Probes with a mean fold-change < 0.5 and a mean fold-change of > 2 [$|\text{Log}_2(\text{fold-change})| > 1$] were selected for differential analysis. Student's *t* test was performed in 1222 selected probes, false discovery rate adjustment^[23] was performed,

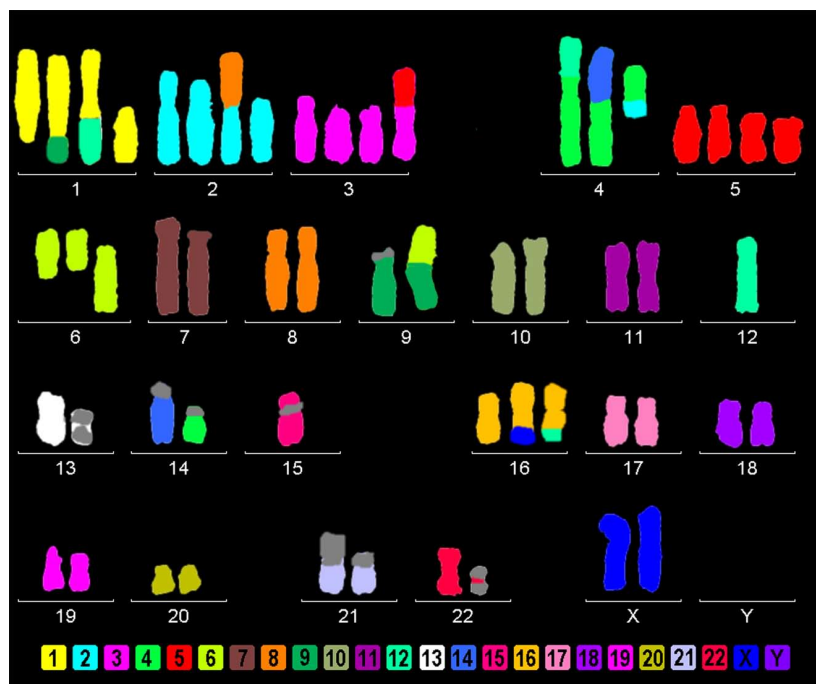


Figure 1 AGP01 cell line multicolor-FISH showing several chromosomal changes, including the monosomy of chromosome 12, where the *PIWIL1* gene is located.

and genes with an adjusted *P*-value of < 0.05 were tagged as DE. For the volcano plot, the fold-change and the *P*-value of all probes were used, and probes were tagged as DE following the previous criteria. Gene ontology enrichment was performed using org. Hs.eg.db^[24] and Gostats^[25] R libraries. All graphical and statistical analyses were performed in the R platform (R Core Team, 2017, Vienna, Austria; <https://www.R-project.org/>).

RESULTS

24-color-FISH using all human WCP probes

24-color-FISH using all human WCP probes revealed in AGP01 cell line a complex karyotype as follows: 63,XX,inv(1)(p12q43),der(1)(1pter->1 p 1 2 :: 1 q 4 3 -> 1 p 1 2 :: 9 p 1 2 ->9pter),+der(1)t(1;12)(q21;q12),+del(1)(p12),+del(2)(p12),+der(2)t(2;8)(p12;q11.2),inv(3)(p21q13)x2,+inv(3)(p21q13),+der(3)t(3;5)(p14;q13),t(4;14)(p12;q11.2),dic(4;12)(p15;q12),+der(4)t(2;4)(p or q?;q12),del(5)(p13)x2,+der(5)x2,del(6)(q12)x2,+del(6)(p21),inv(7)(p12;q11.2),der(7),der(9)t(9;acro)(p21;p12),der(9)t(6;9)(p12;p12),t(13;13)(p10),der(15)(:q13->p11::p11->qter),-15,der(16)t(X;16)(q or p?;q23),+der(16)t(12;16)(q12;q23),21p+,t(22;22)(p10) (Figure 1).

From the analysis, we verified that the unique chromosome 12 (where *PIWIL1* gene is located) remains intact, without translocations or derivative chromosomes. It is important to note that the monosomy of chromosome 12 agrees with the sequencing result, since the 7 bp insert sequence was observed in hemizygous status.

Targeted knockout of the *PIWIL1* gene using the CRISPR-Cas9 system

PIWIL1 gene knockout was successful, as determined by Sanger sequencing. The latter revealed an insertion of 7 adenines in the *PIWIL1* gene sequence (Figure 2), which caused a frameshift mutation that impaired protein synthesis.

Prediction of the encoded protein indicated a premature stop codon (Figure 3), suggesting that this insertion generates a truncated protein consisting of 573 amino acids (the wild-type contains 861) with a loss-of-function phenotype, which means that knockout was efficient.

Notably, the *PIWIL1* knockout cell line remained viable and could be used for further experiments.

Wound-healing assay

The *PIWIL1* gene knockout caused a significant decrease in AGP01 migration capacity after 24 h ($P < 0.01$; Figure 4), which is consistent with the fact that this protein is related to various pathways that regulate cell motility.

Boyden chamber invasion assay

Also, *PIWIL1* gene knockout caused a significant decrease in AGP01 invasiveness ($P < 0.001$; Figure 5), which is also consistent with the fact that this protein is related to various pathways that regulate cell motility.

mRNA array and gene ontology enrichment

Differential analysis: By comparing expression profiles after *PIWIL1* permanent knockout in the AGP01 cell line, a total of 251 mRNA were found to be DE

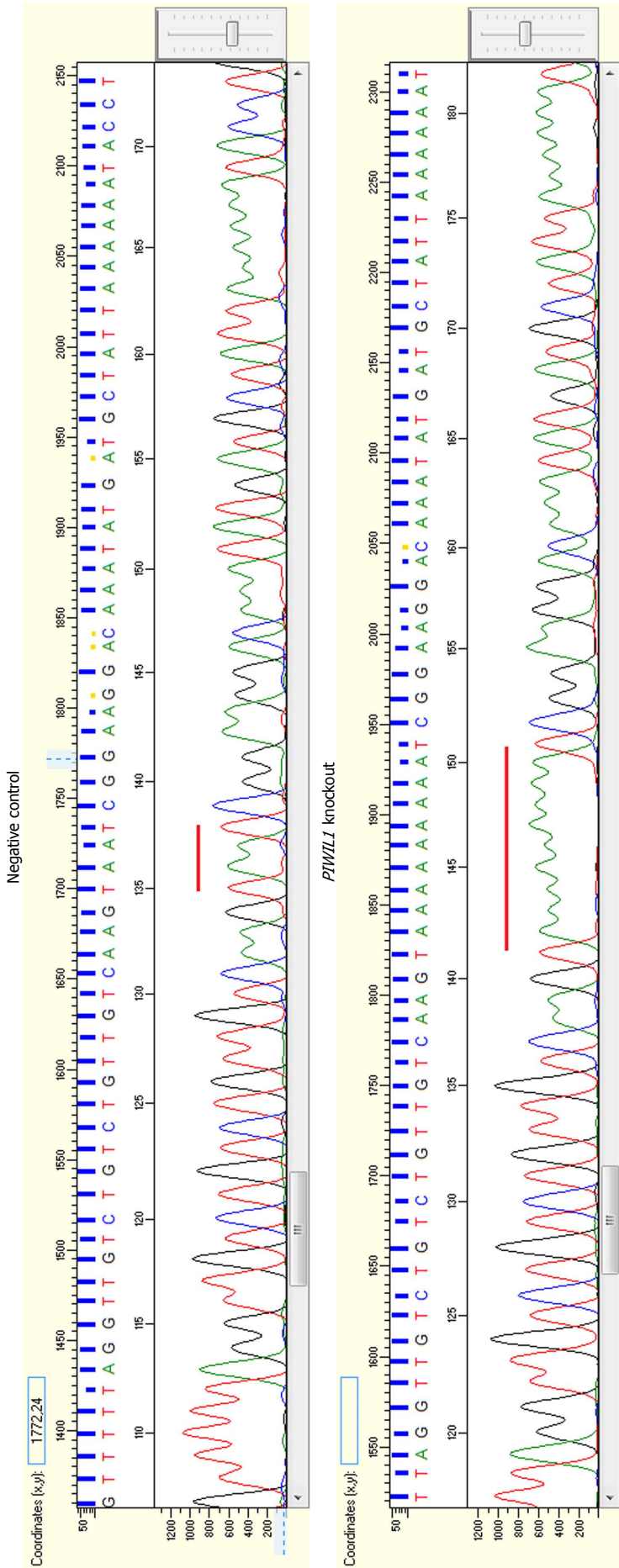


Figure 2 Electropherograms showing the insertion of seven adenines in the *PIWIL1* gene sequence after using the CRISPR-Cas9 system (B) in comparison with the reference sequence of the negative control (A).

[adjusted *P*-value of < 0.05 and |Log2(Fold-Change)| > 1]. A total of 43 mRNA probes were up-regulated and 208 were down-regulated (Figure 6). The DE genes are described in Supplementary Table 2.

We performed a functional analysis by grouping all DE mRNAs. This approach revealed that a total of 35 genes (five up-regulated and 30 down-regulated) encoded proteins involved in invasion and migration cellular processes (Supplementary Figure 1; Supplementary Tables 3 and 4).

According to the current literature, 9 of these 35 genes (*DOCK2*, *ZNF503*, *PDE4D*, *ABL1*, *ABL2*, *LPAR1*, *SMAD2*, *WASF3* and *DACH1*) are possibly related to the mechanisms used by *PIWIL1* to promote carcinogenic effects related to migration and invasion, since their functions are consistent with the changes observed (being up- or down-regulated after knockout).

DISCUSSION

Evidence indicating that *PIWIL1* is an oncogene that regulates several cellular mechanisms important for the carcinogenic process of many types of cancers is rising in recent years. *PIWIL1* seems to be especially implicated in proliferating activity of cancer cells^(8,10,26,27).

Here, we introduce a new gastric cell line, *i.e.*, AGP01, and provide a first description of its karyotype. As is usual for cancer cell lines, there were slight changes from

861 aa
3591
nucleotides,
1196 amino
acids

```

1 YWYGVQTRG RRPGGGVHPP GKRAVARCP RVPGSLGNPA PKARWARAEG GPGRSAARRD
61 LRGSRWGWP RAEVQGPGLG RGQRSKK*KT MTGRARARAR GRARQETAQ LVGSTASQQP
121 GYIQPRPQPP PAEGELFGRG RQRGTAGGTA KSQGLQISAG FQELSLAERG GRRRDFHDLG
181 VNTRQNLQDHV KESKTGSSGI IVRNSTNHFR LTSRPQWALY QYHIDYNPLM EARRLSALL
241 FQHEDLIGKC HAFDGTILFL PKRLQQKYTE VFSKTRNGED VRITITLTNE LPPTSPTCLQ
301 FYNIIFRRL KINLQQIGR NYYNPNDPID IPSHRLVIWP GFTTSILQYE NSIMLCTDVS
361 HKVLRSETVL DFMFNFYHQT EEHKFQEVS KELIGLVVLT KYNNKTYRVD DIDWDQNPKS
421 TFKKADGSEV SFLEYRQKY NQEITDLKQP VLVSQPKRRR GPGGTLPGPA MLIPELCYLT
481 GLTDKMRNDF NVMKDLAVHT RLTPERQRE VGRLIDYIHK NDNVQRELRD WGLSFDSNLL
541 SFSGRILQTE KIHQGGKTFD YNPQFADWSK ETRGAPLISV KPLDNWLLIY TRRNYEAANS
601 LIQNLFKVTP AMGMQMRKAI MIEVDDRTEA YLRVLQQKVT ADTQIVVCLL SSNRKDKYDA ----- Amino acids sequence in
661 IKKYLCTDCP TPSQCVVART LGKQQTMAI ATKIALQMNC KMGGELWRVD IPLKLVMIVG ----- the wild-type PIWIL1
721 IDCYHDMTAG RRSIAGFVAS INEGMTRWFS RCIFQDRGQE LVDGLKVCLQ AALRAWNSCN
781 EYMPSRIIVY RDGVGDGQLK TLVNYEVPQF LDCLKSIGRG YNPRLTIVV KKRVNTRFFA
841 QSGRRLQNPL PGTVIDVEVT RPEWYDFFIV SQAVRSGSVS PTHYNVIYDN SGLKPDHIQR ----- Stop codon of wild-type
901 LTYKLCHIYY NWPGVIRVPA PCQYAHKLAF LVGQSIHREP NLSLSNRLYY L*PAEDDAAA ----- PIWIL1
961 FLFEMTLGFF AFIYFFFNC YLSGNLRG LGDLAFYFH CYSPASLFYT KLRFYILSS
1021 CFSIFCEHF FVYFEEMWIR YLVVNRLSE SINVFGDL KRTFRSEQVL LINLYLYF*
1081 DTCFEFKGDK RRVKGCSLQP VGFQLISR KVLLYNLYT RYRRKYAFL FRGARLYGS
1141 KKNIENFIV QRNILRLFNK KGHEISILT LLFILFNWD MILFVIKN* CDCHLI

```

Wild-type PIWIL1 protein sequence

573 aa
3598
nucleotides,
1199 amino
acids

```

1 YWYGVQTRG RRPGGGVHPP GKRAVARCP RVPGSLGNPA PKARWARAEG GPGRSAARRD
61 LRGSRWGWP RAEVQGPGLG RGQRSKK*KT MTGRARARAR GRARQETAQ LVGSTASQQP
121 GYIQPRPQPP PAEGELFGRG RQRGTAGGTA KSQGLQISAG FQELSLAERG GRRRDFHDLG
181 VNTRQNLQDHV KESKTGSSGI IVRNSTNHFR LTSRPQWALY QYHIDYNPLM EARRLSALL
241 FQHEDLIGKC HAFDGTILFL PKRLQQKYTE VFSKTRNGED VRITITLTNE LPPTSPTCLQ
301 FYNIIFRRL KINLQQIGR NYYNPNDPID IPSHRLVIWP GFTTSILQYE NSIMLCTDVS
361 HKVLRSETVL DFMFNFYHQT EEHKFQEVS KELIGLVVLT KYNNKTYRVD DIDWDQNPKS
421 TFKKADGSEV SFLEYRQKY NQEITDLKQP VLVSQPKRRR GPGGTLPGPA MLIPELCYLT
481 GLTDKMRNDF NVMKDLAVHT RLTPERQRE VGRLIDYIHK NDNVQRELRD WGLSFDSNLL
541 SFSGRILQTE KIHQGGKTFD YNPQFADWSK ETRGAPLISV KPLDNWLLIY TRRNYEAANS
601 LIQNLFKVTP AMGMQMRKAI MIEVDDRTEA YLRVLQQKVT ADTQIVVCLL SSKKKSEGQI ----- Alteration in amino
661 RCY*KIPVYR LPYPKSVCGG PNLRQTANCH GHCYKDCPTD ELQDGRRAL EGGHPEARD ----- acid sequence
721 RWRLLP*HD SWAEVNRRIC CHQ*RDDPL VLTLHISG*R TGAGRWAQSL PASGSEGLE*
781 LQ*VHAQPDH RVPRRRRRP AENTGELRSA TVFGLSKIHW *RLQP*TNGN CGEEKSEHQI
841 FCSVWRTSE STSWSY*CR GYQTRV*LF YREPGCEKW* CFSHLQCHL *QRPEARPH
901 TALDLQAVPH LLQLARCHSC SCSLPVRPQA GFSCWPESYSQ RASVTVKPP LLPLTCRRRC
961 SRSF*NDFG IFLSFLLFF *LLSFW*KLG KGIRRSSILF LALLFTGFLI LYVKIKILYF
1021 IFLFLIDL* AFFCLF*RNV DKILGSIKQT L*EYLKCVWR FT*TYFQE*A SPTYKPILTL
1081 FLRYLF*IR R*EA*SRMLT TTIGGVSAHI LKIKGTII*P IHKIQEKICL IFIWQGG*VV
1141 WE*KKH*KFL NCPKKHFKTL *QKRP*VNLY INITIYFVLE LGHDSICYKI KLM*LSPYL

```

Predict sequence of PIWIL1 after knockout

Figure 3 Amino acid sequences of the wild-type PIWIL1 protein and the PIWIL1 protein after the insertion of seven adenines by the CRISPR-Cas9 system.

cell to cell concerning number of chromosomes or single cell chromosomal rearrangements^[28]. The here-given karyotype was the most frequently observed one. Interestingly, inversions, dicentrics and reciprocal translocations of homologous acrocentric (#13, #15, #22) was observed. Overall, gain of the following regions was present: #1, #3, large parts of #2 and #5, 8q11.2 to 8qter, 12pter to 12q12. Besides, the following regions were under-represented: 2pter to 2p12, 9pter to 9p12, 15q12 to 15qter. These imbalances are in concordance with the literature^[29].

In AGP01, we performed for the first time an *in*

vitro knockout experiment of *PIWIL1* gene using the CRISPR-Cas9 system. It could be shown that absence of this gene significantly impairs migration and invasion capacity of AGP01 cells. Thus, the AGP01 cell line behaves like that previously reported for gastric cancer cells^[12] or lung adenocarcinoma^[26]. Together, these studies suggest that *PIWIL1* expression is strongly associated with an increased aggressiveness of cancer cells.

According to Wang *et al.*^[30], one of the mechanisms by which *PIWIL1* regulates the migration and invasion of cancer cells is by promoting the expression of MMP2

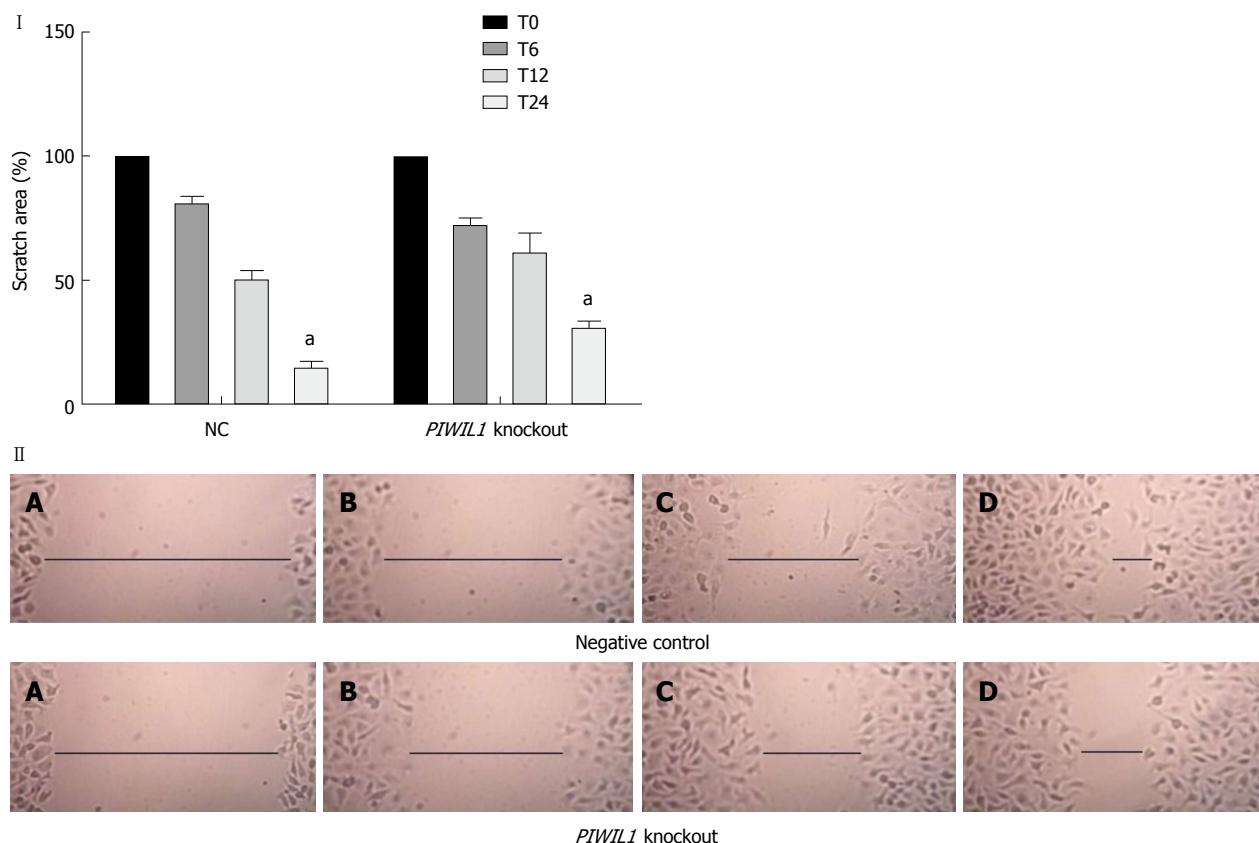


Figure 4 Analysis of the migration capacity of the AGP01 cell line with and without *PIWIL1* gene knockout. T0: Immediately after injury; T6: 6 h after injury; T12: 12 h after injury; T24: 24 h after injury. NC: Negative control. ^a*P* < 0.01. Two-way ANOVA, Bonferroni post-test. Photomicrography of AGP01 cell migration. A: Immediately after injury; B: 6 h after injury; C: 12 h after injury; D: 24 h after injury. The black lines represent approximation of the edges over time, demonstrating the migration capacity of the cells.

and MMP9, two important metalloproteinases involved in the degradation of the extracellular matrix, thereby creating paths for the locomotion of cancer cells^[31].

Additionally, Ameer *et al.*^[32] demonstrated that the over-expression of *PIWIL1* down-regulates the tumor suppressor gene *IGFBP5*, a member of the insulin-like growth factor binding protein family and whose expression is implicated in suppressing epithelial-mesenchymal transition and reducing the expression of E-cadherin and HIF1 α , indicating that it is critically related to cancer progression^[33,34].

Data obtained from our gene expression experiments also provided corroborating evidence that the *PIWIL1* gene plays a key role in cancer cell migration and invasion because several genes involved in these cellular processes were observed as DE when the cell lines were compared before and after *PIWIL1* knockout.

Many studies have demonstrated the oncogenic activities of the *DOCK2*, *ZNF503*, *PDE4D*, *ABL1*, *ABL2*, *LPAR1*, *SMAD2* and *WASF3* genes and their relation to tumor aggressiveness in several types of cancer, including gastric cancer^[35-58]. Interestingly, *PIWIL1* knockout led to a decreased expression of these genes as well as an increased expression of the tumor suppressor gene *DACH1*, demonstrating that *PIWIL1* plays a crucial role in the pathway of development and progression of gastric cancer, and is likely a promising

candidate for therapeutic intervention.

Zhu *et al.*^[53] reported that the over-expression of *DACH1* impaired the proliferation and invasion ability of lung adenocarcinoma cells *in vitro* via the down-regulation of *PRX3*, an oncoprotein required for the maintenance of mitochondrial function and tumorigenesis^[59]. *DACH1* expression also inhibited epithelial-mesenchymal transition and metastasis by affecting TGF- β signaling and decreased proliferation of cancer cells by inducing cell cycle arrest at the G2/M phase^[60,61].

Regarding the reported oncogenes, Rahrman *et al.*^[37] observed that *PDE4D* is over-expressed in human prostate cancer and demonstrated that the knockdown of this gene reduced the growth and migration of prostate cancer cells *in vitro* as well as the growth and proliferation rate of prostate cancer xenografts *in vivo*^[38]. Delyon *et al.*^[39] demonstrated that *PDE4D* is also over-expressed in melanoma cell lines and pinpointed this gene as a regulator of cell invasion by interacting with *FAK* through *RACK1*, constituting a signaling pathway that when activated promotes tumor progression and metastasis^[43].

Recent studies have determined the role of ABL members from the tyrosine kinase family, *ABL1* and *ABL2*, in the development of many types of solid tumors. These proteins induce the activation of actin polymerization machinery by modulating the expression

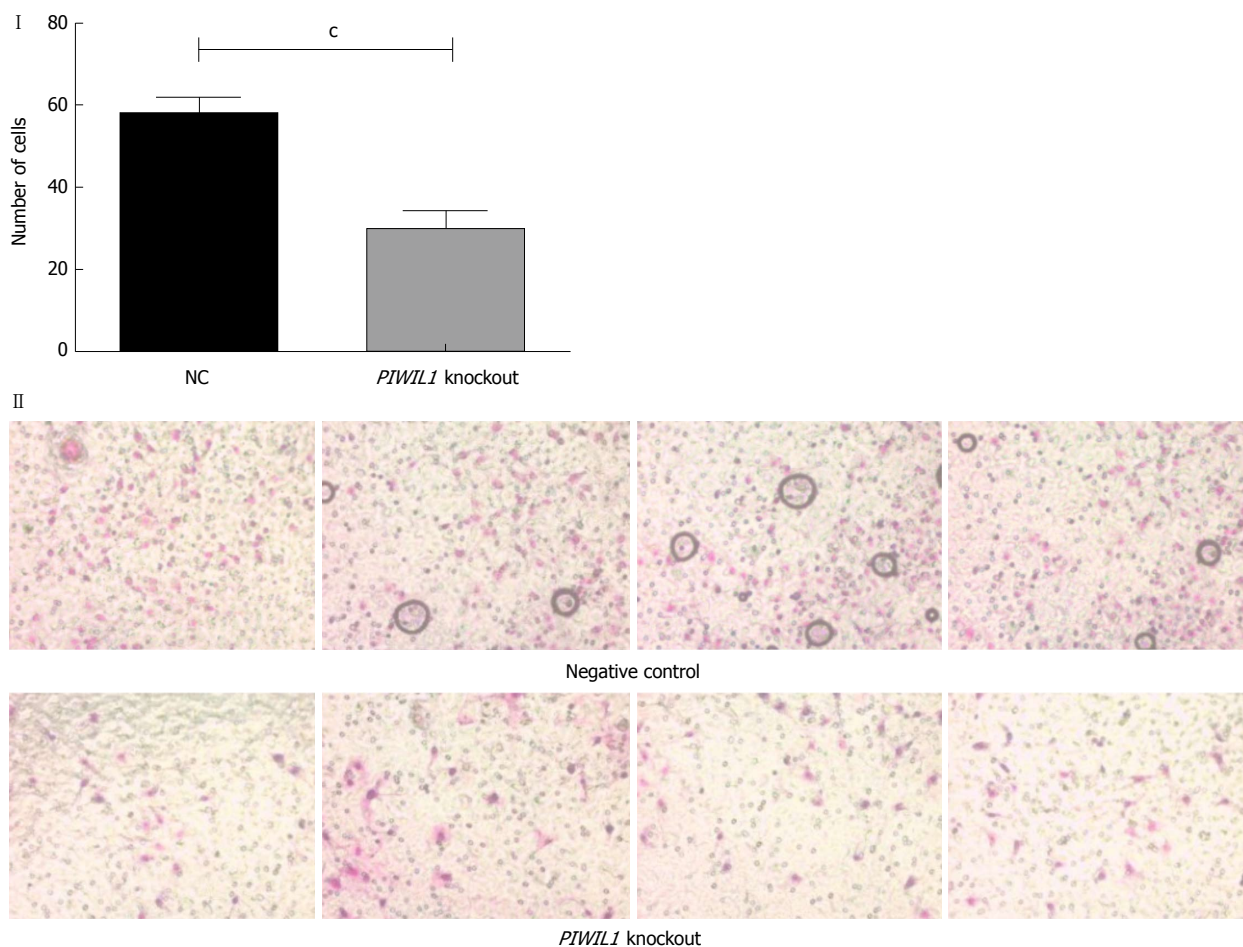


Figure 5 Analysis of the invasion capacity of the AGP01 cell line with and without the *PIWIL1* gene knockout. Statistically significant difference between groups was shown by the Student's *t* test ($P < 0.001$). Photomicrography of the cell invasion assay demonstrating the decrease in the number of cells that invaded when *PIWIL1* was knocked out. NC: Negative control.

of several MMPs to promote morphological changes, including the formation of membrane protrusions and altered cell adhesion. Consequently, activation of ABL1 and ABL2 in cancer cells promote enhanced proliferation, migration and invasion, as well as drug resistance^[39-42].

DOCK2 (dedicator of cytokinesis) belongs to the *DOCK* family of proteins and is expressed in hematopoietic cells^[44]. According to Kulkarni *et al.*^[45], *DOCK2* has been reported to activate Rac, which is known to regulate several crucial processes, including lymphocyte migration, activation and differentiation of T cells^[46]. Wang *et al.*^[47] knocked out *DOCK2* in a B-cell lymphoma cell line and observed a decrease in Rac1 expression. Additionally, analysis of the growth curves of both cell lines demonstrated that the *DOCK2* knockout grew less than *DOCK2*, as evidenced by the lower cell proliferation.

ZNF503 is expressed in the mammary gland and other tissues, and there is a high incidence of association between this gene deregulation and tumor aggressiveness in several kinds of tissues, such as lung, kidney and intestine^[49]. Shahi *et al.*^[48] performed scratch and 3D Matrigel culture assays in two mammary

epithelial cell lines to analyze the cell motility and migration. Both assays demonstrated that cell lines with *ZNF503* knockout migrated less, did not close the gaps, and inhibited invasiveness when compared to the control cells. These data indicate that *ZNF503* promotes cellular invasion and migration, and high levels of this gene are closely related with poor patient survival, breast cancer progression and increased metastasis.

Yu *et al.*^[50] demonstrated that the *lysophosphatidic acid receptor 1 (LPAR1)* gene is related to migration and invasion in ascites from ovarian cancer and is expressed at higher levels in metastatic cell lines, when compared to non-metastatic cell lines. They also observed that the presence of high levels of lysophosphatidic acid are directly connected to cell migration stimulation, and *LPAR1* silencing reduced lysophosphatidic acid-induced invasion. Additionally, in breast tumors, a higher expression of *LPAR1* is related to a worse lung metastasis-free survival rate^[51].

Wiskott-Aldrich syndrome protein family 3 (*WASF3*) is an important gene, which has C-terminal domains that are responsible for actin polymerization activation, playing a role in cell proliferation and migration. The *WASF3* gene is normally over-expressed in several types

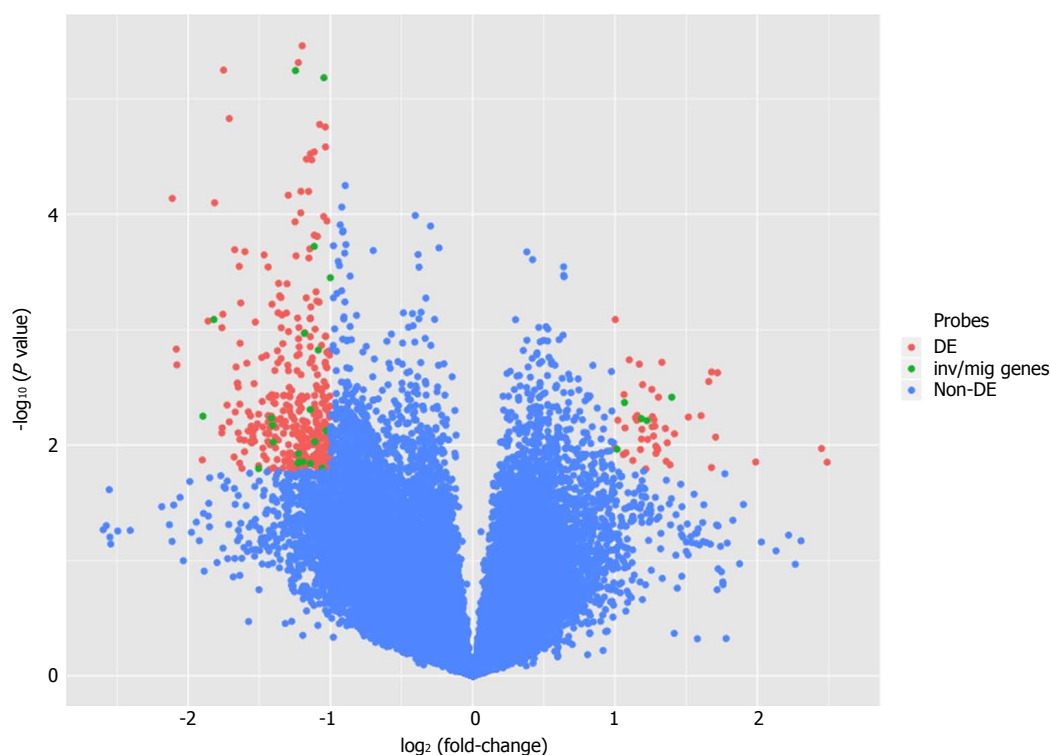


Figure 6 Volcano plot comparing gene expression after *PIWIL1* permanent knockout in the gastric cancer AGP01 cell line. Differentially expressed probes [adjusted *P*-value of < 0.05 and |Log₂(Fold-Change)| > 1] are on superior left and right areas (red). mRNAs involved in invasion and migration processes are in green.

of tumors, such as breast cancer, osteosarcoma and prostate cancer^[52,53]. In gastric cancer, little is known about this gene; however, since micro (mi)RNAs and their targets are considered potential biomarkers for gastric cancer, Wang *et al.*^[54] performed a luciferase assay and western blotting to investigate the relationship between miR-218 and *WASF3*. Their results demonstrated that over-expression of *WASF3* harms miR-218 and results in the inhibition of cell proliferation and migration, suggesting that *WASF3* is over-expressed in gastric cancer and induces cell proliferation and migration. Additionally, in qRT-PCR, *WASF3* mRNA expression levels were higher when compared to normal gastric cell lines.

Smad2 is the first intracellular protein in the signaling cascade of the TGF- β 1 signaling pathway, which is involved in the progression of gastric cancer. In advanced stages of cancer, TGF- β 1 acts as an oncogene, regulating multiple cellular functions, including stimulation of proliferation, differentiation and the inhibition of apoptosis^[55,57].

Interestingly, Lv *et al.*^[56] observed that TGF- β 1 levels in peritoneal lavage fluid are directly connected to peritoneal metastasis. Corroborating evidence was provided by Shinto *et al.*^[58], whose experiments demonstrated that p-Smad2 expression was higher in diffuse-type tumors and in peritoneal metastasis cases. Notably, the AGP01 cell line used to perform the *PIWIL1* knockout in our study was obtained from a patient with peritoneal metastasis, and we found *SMAD2* was over-expressed.

Taken together, these data reinforce the idea that *PIWIL1* plays a crucial role in the signaling pathway

of gastric cancer, regulating several genes involved in migration and invasion processes; therefore, its use as a therapeutic target may generate promising results in the treatment of gastric cancer, mainly in patients with peritoneal carcinomatosis, which is a condition associated with poor prognosis and a decreased overall survival.

ARTICLE HIGHLIGHTS

Research background

Gastric cancer (GC) remains a major public health problem, having the third highest incidence of death worldwide. *Piwi like RNA-mediated gene silencing 1* (*PIWIL1*) is involved in regulation of widespread biological processes, including stem cell proliferation, embryogenesis, growth, and development, and has been found to be frequently over-expressed in various tumor types, including GC. Previous studies have demonstrated that *PIWIL1* is implicated in improving tumor malignant behavior. *PIWIL1* expression has been shown to be absent in normal somatic tissues, making it a very intriguing target for therapy. We attempted to investigate the role of *PIWIL1* on the migration and invasion capacity of metastatic GC cells, using the AGP01 cell line, as well as checking the expression status of genes and proteins involved in these cellular processes, in order to elucidate the mechanisms by which *PIWIL1* provokes tumorigenic effects and to shed light on potential new strategies to target *PIWIL1*.

Research motivation

Many aspects of gastric carcinogenesis remain elusive, and much effort has been made to improve patient prognosis. The *PIWIL1* has been identified as a novel extremely highly expressed gene in many types of cancer and its expression in GC tissue is related to poorer overall survival, suggesting that high expression of *PIWIL1* is associated with poor prognosis and that it could be used as a predictive marker or even a target for therapy. Although *PIWIL1* has been correlated with worse outcome, the involved mechanisms remain

unclear, and many hypotheses are being tested. Once the upstream and downstream signaling pathways of *PIWIL1* are elucidated, it will be possible to create new therapeutic strategies for gastric carcinogenesis, in order to improve the overall health of patients affected by this disease.

Research objectives

We performed permanent knockout of the *PIWIL1* gene to verify phenotypic modifications in the AGP01 metastatic GC cell line, as well as alterations in expression level of mRNA and protein, in an attempt to better understand the mechanisms by which *PIWIL1* promotes tumor malignant behavior. This research demonstrates the importance of studying *PIWIL1* in GC, since data obtained through the achievement of our objectives showed that this protein has a crucial role in gastric carcinogenesis, promoting molecular and phenotypic alterations compatible with enhanced tumor aggressiveness. The elucidation of the role of *PIWIL1* protein in cancer cell invasion and migration will pave the way for developing potential clinical interventions, aiming to control GC dissemination.

Research methods

We applied CRISPR/Cas9 technology to knockout the *PIWIL1* gene in a metastatic GC cell line, and analyzed its phenotypic modifications, as well as alterations in gene and protein expression. CRISPR-Cas9 technology was considered in 2015 as one of the most important technological advances of science. Mainly, it allows permanent silencing of the target gene and also creates a stable and permanent cell line with the desired modification. By this way, multiple experiments can be carried on, including long term evaluation of the downstream events caused by the molecular alteration, as well as discovering potential pathways influenced by the studied gene. Therefore, after permanent knockout of *PIWIL1* in the AGP01 cell line, we analyzed phenotypic modifications by performing wound-healing and Boyden chamber invasion assays, to assess migration and invasion, respectively. Moreover, aiming to shed light on the molecular mechanisms used by *PIWIL1* to make changes in the migration and invasion capability of cells, we carried out proteomic and microarray assays, using multidimensional protein identification technology (commonly known as MudPIT) and a one-color microarray-based gene expression analysis kit, respectively.

Research results

PIWIL1 gene knockout was successfully performed and confirmed by Sanger sequencing, which revealed an insertion of seven adenines in the *PIWIL1* gene sequence. *In silico* prediction of the encoded protein pointed to the appearance of a premature termination codon, suggesting that this insertion generates a truncated protein with a loss-of-function phenotype. *PIWIL1* knockout promoted a significant decrease in cell migration and invasion capacity ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively), which is consistent with data present in the literature demonstrating that this protein is implicated in several signaling pathways that regulate cell motility. By comparing expression profiles after *PIWIL1* knockout, a total of 251 mRNA were found to be differentially expressed, with 43 up-regulated and 208 down-regulated mRNA. A functional analysis grouping all differentially expressed mRNAs demonstrated that 35 genes encoded proteins were involved in invasion and migration cellular processes. After extensive review of data presented in the literature, we selected 9 of these 35 genes (*DOCK2*, *ZNF503*, *PDE4D*, *ABL1*, *ABL2*, *LPAR1*, *SMAD2*, *WASF3* and *DACH1*) as possibly related to the mechanisms used by *PIWIL1* to promote carcinogenic effects related to migration and invasion, since their functions are consistent with the changes observed (being up- or down-regulated after knockout). Additionally, the analysis of proteomic data revealed that *PIWIL1* knockout caused modification in the expression of 27 proteins involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT). Twenty-two oncoproteins related to EMT promotion, including *FGFR1*, *PCNA*, *ACTN4*, *GSN* and *TUBB3*, were expressed in the AGP01 cell line before knockout and reduced to a level that were not detectable by the technique after knockout. On the other hand, *PIWIL1* knockout caused an increase in the expression of six proteins implicated in EMT suppression, such as *ACSM3*, *ADGRG1* and *ANPEP*, that were absent in AGP01 before knockout. To the best of our knowledge, this is the first report describing molecular alteration compatible with phenotypic alterations after permanent knockout of *PIWIL1* in GC. Detailed mechanisms leading to *PIWIL1* over-expression in cancer as well as the pathways by which this protein

improves the malignant phenotype should be further investigated.

Research conclusions

In the current study, we pioneered the performance of an *in vitro* knockout of the *PIWIL1* gene by using the CRISPR-Cas9 system, and found that absence of this gene significantly impaired the migration and invasion capacity of the AGP01 cell line, besides modifying mRNA and protein expression of potential molecular targets involved in the EMT process. The results of such experiments contributed to understanding of the mechanisms used by *PIWIL1* to promote alteration in migration and invasion capacity of gastric cells during tumorigenesis, and also revealed the participation of new players related to *PIWIL1* expression, such as *FGFR1*, *PCNA*, *ACTN4*, *PDE4D* and *SMAD2*. Our results demonstrated that knockout of *PIWIL1* promotes several changes in cell phenotype, suggesting the critical role of the *PIWIL1* oncogene in GC, and confirmed the hypothesis that *PIWIL1* expression provokes migration, invasiveness and EMT as potential mechanisms of improved tumor aggressiveness. The presented findings open new perspectives for molecular interventions in GC.

Research perspectives

Definite silencing of *PIWIL1* by the CRISPR-Cas9 system resulted in robust findings favoring the discovery of new mechanisms involved in gastric carcinogenesis. The presented results must be validated by other researchers, and if confirmed, might lead to innovative interventions aiming to treat GC.

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. *Int J Cancer* 2015; **136**: E359-E386 [PMID: 25220842 DOI: 10.1002/ijc.29210]
- 2 **Wu HH**, Lin WC, Tsai KW. Advances in molecular biomarkers for gastric cancer: miRNAs as emerging novel cancer markers. *Expert Rev Mol Med* 2014; **16**: e1 [PMID: 24456939 DOI: 10.1017/erm.2013.16]
- 3 **Assumpção CB**, Calcagno DQ, Araújo TM, Santos SE, Santos ÂK, Riggins GJ, Burbano RR, Assumpção PP. The role of piRNA and its potential clinical implications in cancer. *Epigenomics* 2015; **7**: 975-984 [PMID: 25929784 DOI: 10.2217/epi.15.37]
- 4 **Navarro A**, Tejero R, Viñolas N, Cordeiro A, Marrades RM, Fuster D, Caritg O, Moises J, Muñoz C, Molins L, Ramirez J, Monzo M. The significance of PIWI family expression in human lung embryogenesis and non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2015; **6**: 31544-31556 [PMID: 25742785 DOI: 10.18632/oncotarget.3003]
- 5 **Tan Y**, Liu L, Liao M, Zhang C, Hu S, Zou M, Gu M, Li X. Emerging roles for PIWI proteins in cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2015; **47**: 315-324 [PMID: 25854579 DOI: 10.1093/abbs/gmv018]
- 6 **Siddiqi S**, Matushansky I. Piwis and piwi-interacting RNAs in the epigenetics of cancer. *J Cell Biochem* 2012; **113**: 373-380 [PMID: 21928326 DOI: 10.1002/jcb.23363]
- 7 **Siddiqi S**, Terry M, Matushansky I. Hiwi mediated tumorigenesis is associated with DNA hypermethylation. *PLoS One* 2012; **7**: e33711 [PMID: 22438986 DOI: 10.1371/journal.pone.0033711]
- 8 **Litwin M**, Szczepańska-Buda A, Piotrowska A, Dziegiel P, Witkiewicz W. The meaning of PIWI proteins in cancer development. *Oncol Lett* 2017; **13**: 3354-3362 [PMID: 28529570 DOI: 10.3892/ol.2017.5932]
- 9 **Li C**, Zhou X, Chen J, Lu Y, Sun Q, Tao D, Hu W, Zheng X, Bian S, Liu Y, Ma Y. *PIWIL1* destabilizes microtubule by suppressing phosphorylation at Ser16 and RLIM-mediated degradation of Stathmin1. *Oncotarget* 2015; **6**: 27794-27804 [PMID: 26317901 DOI: 10.18632/oncotarget.4533]
- 10 **Chen Z**, Che Q, He X, Wang F, Wang H, Zhu M, Sun J, Wan X. Stem cell protein Piwil1 endowed endometrial cancer cells with stem-like properties via inducing epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 2015; **15**: 811 [PMID: 26506848 DOI: 10.1186/

- s12885-015-1794-8]
- 11 **Wang Y**, Liu Y, Shen X, Zhang X, Chen X, Yang C, Gao H. The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2012; **5**: 315-325 [PMID: 22670175]
 - 12 **Liu X**, Sun Y, Guo J, Ma H, Li J, Dong B, Jin G, Zhang J, Wu J, Meng L, Shou C. Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *Int J Cancer* 2006; **118**: 1922-1929 [PMID: 16287078 DOI: 10.1002/ijc.21575]
 - 13 **Riordan SM**, Heruth DP, Zhang LQ, Ye SQ. Application of CRISPR/Cas9 for biomedical discoveries. *Cell Biosci* 2015; **5**: 33 [PMID: 26137216 DOI: 10.1186/s13578-015-0027-9]
 - 14 **Hsu PD**, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; **157**: 1262-1278 [PMID: 24906146 DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010]
 - 15 **Jinek M**, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; **337**: 816-821 [PMID: 22745249 DOI: 10.1126/science.1225829]
 - 16 **Chen S**, Sun H, Miao K, Deng CX. CRISPR-Cas9: from Genome Editing to Cancer Research. *Int J Biol Sci* 2016; **12**: 1427-1436 [PMID: 27994508 DOI: 10.7150/ijbs.17421]
 - 17 **Kawahara A**, Hisano Y, Ota S, Taimatsu K. Site-Specific Integration of Exogenous Genes Using Genome Editing Technologies in Zebrafish. *Int J Mol Sci* 2016; **17** [PMID: 27187373 DOI: 10.3390/ijms17050727]
 - 18 **Maeder ML**, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther* 2016; **24**: 430-446 [PMID: 26755333 DOI: 10.1038/mt.2016.10]
 - 19 **Travis J**. Breakthrough of the Year: CRISPR makes the cut. *Science Magazine* 2015; Available from: URL: <http://www.sciencemag.org/news/2015/12/and-science-s-breakthrough-year>
 - 20 **Leal MF**, Martins do Nascimento JL, da Silva CE, Vita Lamarão MF, Calcagno DQ, Khayat AS, Assumpção PP, Cabral IR, de Arruda Cardoso Smith M, Burbano RR. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; **195**: 85-91 [PMID: 19837275 DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2009.04.020]
 - 21 **Liehr T**, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 2002; **9**: 335-339 [PMID: 11891523]
 - 22 **Liehr T**. The Standard FISH Procedure. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) - Application Guide. Berlin: *Springer* 2017; 109-118
 - 23 **Benjamini Y**, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc* 1995; **57**: 289-300
 - 24 **Carlson M**. org.Hs.db: Genome wide annotation for Human. 2017; R package version 3.5.0
 - 25 **Falcon S**, Gentleman R. Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* 2007; **23**: 257-258 [PMID: 17098774 DOI: 10.1093/bioinformatics/btl567]
 - 26 **Xie K**, Zhang K, Kong J, Wang C, Gu Y, Liang C, Jiang T, Qin N, Liu J, Guo X, Huo R, Liu M, Ma H, Dai J, Hu Z. Cancer-testis gene PIWIL1 promotes cell proliferation, migration, and invasion in lung adenocarcinoma. *Cancer Med* 2018; **7**: 157-166 [PMID: 29168346 DOI: 10.1002/cam4.1248]
 - 27 **Sun R**, Gao CL, Li DH, Li BJ, Ding YH. Expression Status of PIWIL1 as a Prognostic Marker of Colorectal Cancer. *Dis Markers* 2017; **2017**: 1204937 [PMID: 28634417 DOI: 10.1155/2017/1204937]
 - 28 **Bloomfield M**, Duesberg P. Karyotype alteration generates the neoplastic phenotypes of SV40-infected human and rodent cells. *Mol Cytogenet* 2015; **8**: 79 [PMID: 26500699 DOI: 10.1186/s13039-015-0183-y]
 - 29 **Gebhart E**, Liehr T. Patterns of genomic imbalances in human solid tumors (Review). *Int J Oncol* 2000; **16**: 383-399 [PMID: 10639584]
 - 30 **Wang X**, Tong X, Gao H, Yan X, Xu X, Sun S, Wang Q, Wang J. Silencing HIWI suppresses the growth, invasion and migration of glioma cells. *Int J Oncol* 2014; **45**: 2385-2392 [PMID: 25269862 DOI: 10.3892/ijo.2014.2673]
 - 31 **Rundhaug JE**. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; **9**: 267-285 [PMID: 15963249]
 - 32 **Amaar YG**, Baylink DJ, Mohan S. Ras-association domain family 1 protein, RASSF1C, is an IGFBP-5 binding partner and a potential regulator of osteoblast cell proliferation. *J Bone Miner Res* 2005; **20**: 1430-1439 [PMID: 16007340 DOI: 10.1359/JBMR.050311]
 - 33 **Wang J**, Ding N, Li Y, Cheng H, Wang D, Yang Q, Deng Y, Yang Y, Li Y, Ruan X, Xie F, Zhao H, Fang X. Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) functions as a tumor suppressor in human melanoma cells. *Oncotarget* 2015; **6**: 20636-20649 [PMID: 26010068 DOI: 10.18632/oncotarget.4114]
 - 34 **Güllü G**, Karabulut S, Akkiprik M. Functional roles and clinical values of insulin-like growth factor-binding protein-5 in different types of cancers. *Chin J Cancer* 2012; **31**: 266-280 [PMID: 22313597 DOI: 10.5732/cjc.011.10405]
 - 35 **Henry C**, Llamasos E, Knipprath-Meszáros A, Schoetzau A, Obermann E, Fuenfschilling M, Caduff R, Fink D, Hacker N, Ward R, Heinzelmann-Schwarz V, Ford C. Targeting the ROR1 and ROR2 receptors in epithelial ovarian cancer inhibits cell migration and invasion. *Oncotarget* 2015; **6**: 40310-40326 [PMID: 26515598 DOI: 10.18632/oncotarget.5643]
 - 36 **Henry CE**, Llamasos E, Djordjevic A, Hacker NF, Ford CE. Migration and invasion is inhibited by silencing ROR1 and ROR2 in chemoresistant ovarian cancer. *Oncogenesis* 2016; **5**: e226 [PMID: 27239958 DOI: 10.1038/oncsis.2016.32]
 - 37 **Rahrmann EP**, Collier LS, Knutson TP, Doyal ME, Kuslak SL, Green LE, Malinowski RL, Roethe L, Akagi K, Waknitz M, Huang W, Largaespada DA, Marker PC. Identification of PDE4D as a proliferation promoting factor in prostate cancer using a Sleeping Beauty transposon-based somatic mutagenesis screen. *Cancer Res* 2009; **69**: 4388-4397 [PMID: 19401450 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3901]
 - 38 **Delyon J**, Servy A, Laugier F, André J, Ortonne N, Battistella M, Mourah S, Bensussan A, Lebbé C, Dumaz N. PDE4D promotes FAK-mediated cell invasion in BRAF-mutated melanoma. *Oncogene* 2017; **36**: 3252-3262 [PMID: 28092671 DOI: 10.1038/onc.2016.469]
 - 39 **Greuber EK**, Smith-Pearson P, Wang J, Pendergast AM. Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**: 559-571 [PMID: 23842646 DOI: 10.1038/nrc3563]
 - 40 **Wang J**, Pendergast AM. The Emerging Role of ABL Kinases in Solid Tumors. *Trends Cancer* 2015; **1**: 110-123 [PMID: 26645050 DOI: 10.1016/j.trecan.2015.07.004]
 - 41 **Gu JJ**, Rouse C, Xu X, Wang J, Onaitis MW, Pendergast AM. Inactivation of ABL kinases suppresses non-small cell lung cancer metastasis. *JCI Insight* 2016; **1**: e89647 [PMID: 28018973 DOI: 10.1172/jci.insight.89647]
 - 42 **Wang J**, Rouse C, Jasper JS, Pendergast AM. ABL kinases promote breast cancer osteolytic metastasis by modulating tumor-bone interactions through TAZ and STAT5 signaling. *Sci Signal* 2016; **9**: ra12 [PMID: 26838548 DOI: 10.1126/scisignal.aad3210]
 - 43 **Sulzmaier FJ**, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 598-610 [PMID: 25098269 DOI: 10.1038/nrc3792]
 - 44 **Tajiri H**, Uruno T, Shirai T, Takaya D, Matsunaga S, Setoyama D, Watanabe M, Kukimoto-Niino M, Oisaki K, Ushijima M, Sanematsu F, Honma T, Terada T, Oki E, Shirasawa S, Maehara Y, Kang D, Côté JF, Yokoyama S, Kanai M, Fukui Y. Targeting Ras-Driven Cancer Cell Survival and Invasion through Selective Inhibition of DOCK1. *Cell Rep* 2017; **19**: 969-980 [PMID: 28467910 DOI: 10.1016/j.celrep.2017.04.016]
 - 45 **Kulkarni K**, Yang J, Zhang Z, Barford D. Multiple factors confer specific Cdc42 and Rac protein activation by dedicator of cytokinesis (DOCK) nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* 2011; **286**: 25341-25351 [PMID: 21613211 DOI: 10.1074/jbc.M111.236455]
 - 46 **Wu M**, Small D, Duffield AS. DOCK2: A novel FLT3/ITD

- leukemia drug target. *Oncotarget* 2017; **8**: 88253-88254 [PMID: 29179430 DOI: 10.18632/oncotarget.21390]
- 47 **Wang L**, Nishihara H, Kimura T, Kato Y, Tanino M, Nishio M, Obara M, Endo T, Koike T, Tanaka S. DOCK2 regulates cell proliferation through Rac and ERK activation in B cell lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **395**: 111-115 [PMID: 20350533 DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.03.148]
- 48 **Shahi P**, Slorach EM, Wang CY, Chou J, Lu A, Ruderisch A, Werb Z. The Transcriptional Repressor ZNF503/Zeppo2 Promotes Mammary Epithelial Cell Proliferation and Enhances Cell Invasion. *J Biol Chem* 2015; **290**: 3803-3813 [PMID: 25538248 DOI: 10.1074/jbc.M114.611202]
- 49 **Shahi P**, Wang CY, Lawson DA, Slorach EM, Lu A, Yu Y, Lai MD, Gonzalez Velozo H, Werb Z. ZNF503/Zpo2 drives aggressive breast cancer progression by down-regulation of GATA3 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**: 3169-3174 [PMID: 28258171 DOI: 10.1073/pnas.1701690114]
- 50 **Yu X**, Zhang Y, Chen H. LPA receptor 1 mediates LPA-induced ovarian cancer metastasis: an in vitro and in vivo study. *BMC Cancer* 2016; **16**: 846 [PMID: 27809800 DOI: 10.1186/s12885-016-2865-1]
- 51 **Sahay D**, Leblanc R, Grunewald TG, Ambatipudi S, Ribeiro J, Clézardin P, Peyruchaud O. The LPA1/ZEB1/miR-21-activation pathway regulates metastasis in basal breast cancer. *Oncotarget* 2015; **6**: 20604-20620 [PMID: 26098771 DOI: 10.18632/oncotarget.3774]
- 52 **Teng Y**, Ghoshal P, Ngoka L, Mei Y, Cowell JK. Critical role of the WASF3 gene in JAK2/STAT3 regulation of cancer cell motility. *Carcinogenesis* 2013; **34**: 1994-1999 [PMID: 23677069 DOI: 10.1093/carcin/bgt167]
- 53 **Zhu Z**, Chen W, Yin X, Lai J, Wang Q, Liang L, Wang W, Wang A, Zheng C. WAVE3 Induces EMT and Promotes Migration and Invasion in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2016; **61**: 1950-1960 [PMID: 26971088 DOI: 10.1007/s10620-016-4102-9]
- 54 **Wang G**, Fu Y, Liu G, Ye Y, Zhang X. miR-218 Inhibits Proliferation, Migration, and EMT of Gastric Cancer Cells by Targeting WASF3. *Oncol Res* 2017; **25**: 355-364 [PMID: 27642088 DOI: 10.3727/096504016X14738114257367]
- 55 **Lv ZD**, Wang HB, Li FN, Wu L, Liu C, Nie G, Kong B, Qu HL, Li JG. TGF- β 1 induces peritoneal fibrosis by activating the Smad2 pathway in mesothelial cells and promotes peritoneal carcinomatosis. *Int J Mol Med* 2012; **29**: 373-379 [PMID: 22139024 DOI: 10.3892/ijmm.2011.852]
- 56 **Lv ZD**, Na D, Ma XY, Zhao C, Zhao WJ, Xu HM. Human peritoneal mesothelial cell transformation into myofibroblasts in response to TGF- β 1 in vitro. *Int J Mol Med* 2011; **27**: 187-193 [PMID: 21152863 DOI: 10.3892/ijmm.2010.574]
- 57 **Wu Y**, Li Q, Zhou X, Yu J, Mu Y, Munker S, Xu C, Shen Z, Müllenbach R, Liu Y, Li L, Gretz N, Zieker D, Li J, Matsuzaki K, Li Y, Dooley S, Weng H. Decreased levels of active SMAD2 correlate with poor prognosis in gastric cancer. *PLoS One* 2012; **7**: e35684 [PMID: 22539990 DOI: 10.1371/journal.pone.0035684]
- 58 **Shinto O**, Yashiro M, Toyokawa T, Nishii T, Kaizaki R, Matsuzaki T, Noda S, Kubo N, Tanaka H, Doi Y, Ohira M, Muguruma K, Sawada T, Hirakawa K. Phosphorylated smad2 in advanced stage gastric carcinoma. *BMC Cancer* 2010; **10**: 652 [PMID: 21110833 DOI: 10.1186/1471-2407-10-652]
- 59 **Song IS**, Jeong YJ, Jeong SH, Heo HJ, Kim HK, Bae KB, Park YH, Kim SU, Kim JM, Kim N, Ko KS, Rhee BD, Han J. FOXM1-Induced PRX3 Regulates Stemness and Survival of Colon Cancer Cells via Maintenance of Mitochondrial Function. *Gastroenterology* 2015; **149**: 1006-1016.e9 [PMID: 26091938 DOI: 10.1053/j.gastro.2015.06.007]
- 60 **Bu XN**, Qiu C, Wang C, Jiang Z. Inhibition of DACH1 activity by short hairpin RNA represses cell proliferation and tumor invasion in pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2016; **36**: 745-754 [PMID: 27278537 DOI: 10.3892/or.2016.4843]
- 61 **Yan W**, Wu K, Herman JG, Brock MV, Zhou Y, Lu Y, Zhang Z, Yang Y, Guo M. Epigenetic silencing of DACH1 induces the invasion and metastasis of gastric cancer by activating TGF- β signalling. *J Cell Mol Med* 2014; **18**: 2499-2511 [PMID: 24912879 DOI: 10.1111/jcmm.12325]

P- Reviewer: Chen Z, Kimura A, Matowicka-Karna J, Park WS
S- Editor: Wang XJ **L- Editor:** Filipodia **E- Editor:** Huang Y





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA
Telephone: +1-925-223-8242
Fax: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
Help Desk: <https://www.f6publishing.com/helpdesk>
<https://www.wjgnet.com>



ISSN 1007-9327

