UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CANDY CHRISTIE BELLIDO MORE

Papel do oncogene *YAP1* no processo de tumorigênese e metástase e efeito de seu inibidor verteporfina nos tumores adrenocorticais pediátricos

> Ribeirão Preto 2022

CANDY CHRISTIE BELLIDO MORE

Papel do oncogene *YAP1* no processo de tumorigênese e metástase e efeito de seu inibidor verteporfina nos tumores adrenocorticais pediátricos

> Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

> Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini Coorientadora: Dra. Ana Carolina Bueno de Queiroz Arruda

Ribeirão Preto 2022 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

BELLIDO MORE, CANDY CHRISTIE

Papel do oncogene *YAP1* no processo de tumorigênese e metástase e efeito de seu inibidor verteporfina nos tumores adrenocorticais pediátricos.

144 p. : il ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini; Coorientadora, Dra. Ana Carolina Bueno de Queiroz Arruda, Ribeirão Preto, 2022

1. Tumor adrenocortical 2. via Hippo 3. YAP1 4. Verteporfina 5. via Wnt/beta-catenina.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

• Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Projeto 2017/17737-7;

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Projeto 2015/19663-5;

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Projeto 2014/03989-6;

Nome: Candy Christie Bellido More

Título: Papel do oncogene *YAP1* no processo de tumorigênese e metástase e efeito de seu inibidor verteporfina nos tumores adrenocorticais pediátricos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.:		
Instituição:		
Julgamento:	Assinatura:	_
Drof Dr.		
Prol. Dr.:		
Instituição:		
Julgamento:	Assinatura:	_
Prof. Dr.:		
Instituição:		
Julgamento:	Assinatura:	_
Prof. Dr.:		
Instituição:		
Julgamento:	Assinatura:	

Dedicatória

A minha família pelo apoio incondicional durante todas as etapas de meu doutorado e por sempre confiar em mim.

Agradecimentos

Ao César Ortiz que se encaminhou junto comigo nesta aventura, foi quem me apoiou e esteve sempre comigo para me dar as forças quando precisei e por me dar uma bonita família junto com nosso filho Adrian.

Ao meu filho Adrian por me ensinar a ser mãe e fazer meus dias mais felizes, por ser meu motor para sempre dar o meu melhor.

Aos meus pais, Alicia e Daniel, pelo amor e cuidados que tiveram comigo. Vocês sempre confiaram em mim e me ensinaram a sempre seguir meus sonhos.

Ao meu sobrinho Bryan, que considero como se fosse um filho, e por que sempre me fez divertir e relaxar ainda de longe.

Aos meus irmãos Jackeline, Christopher e Stephanie, por me acompanhar e me ensinar tantas coisas que me ajudaram no meu desenvolvimento pessoal.

Ao meu orientador o Prof. Dr. Sonir Antonini por acreditar em mim, ainda sem antes me conhecer, por confiar em meu trabalho, ser paciente comigo e por todo o apoio e ensinamentos ao nível profissional e pessoal.

À minha coorientadora, a Dra. Ana Carolina Bueno pelo companheirismo, e me ensinar não só a parte laboratorial, mas também a ser uma boa profissional.

Às companheiras e amigas do laboratório e pós-graduação, Monica Stecchini, Zilda Braid, Aline Falconi, Marcia Elamid e Juliana Gebenlian por me acompanhar durante toda esta etapa e compartilhar gratos momentos.

Aos meus companheiros de laboratório, o Dr. Rui Milton e o Dr. Daniel Ferreira pelas boas discussões sobre temas científicos e me ensinar a querer aprender mais coisas.

Aos professores Dr. Ayrton Moreira e a Prof. Dra. Margaret de Castro pelo exemplo de dedicação e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Fernando Ramalho, do Departamento de Patologia da FMRP-USP, por toda a ajuda no desenvolvimento de meu trabalho e por estar preste a me ensinar.

Às funcionárias do Laboratório de Endocrinologia - Setor de Biologia Molecular, Wendy Turatti e Renata Sicchieri Pugliesi, pela ajuda durante a realização de meu trabalho.

Ao José Roberto Silva do Laboratório de Endocrinologia - Setor de Imunoensaios pela ajuda no desenvolvimento de meu trabalho e pelas boas conversas.

À Dra. Juliana Vargas de Carvalho, que me deu apoio nos ensaios de imunofluorescência e no uso do IVIS, e por sempre se preocupar comigo e estar disposta a me ajudar.

À Dra. Cleide Silva do Laboratório de Experimentação Animal do Hemocentro, por me facilitar e ajudar no desenvolvimento de meus ensaios in vivo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Assim mesmo, à FAPESP pelo apoio financeiro durante meu doutorado.

"Acima de tudo, não tema dos momentos difíceis, o melhor vem deles"

Rita Levi-Montalcini Prêmio Nobel em Medicina, 1986

Resumo

Bellido, C. Papel do oncogene *YAP1* no processo de tumorigênese e metástase e efeito de seu inibidor verteporfina nos tumores adrenocorticais pediátricos. 2022. 144p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

CONTEXTO: Os tumores adrenocorticais (TACs) são raros e agressivos. YAP1, um efetor da via Hippo, é superexpresso em outros tipos de câncer. Recentemente, foi demonstrado que a superexpressão de YAP1 se associa com pior prognóstico de pacientes pediátricos com TAC.

OBJETIVOS: Avaliar o papel do oncogene *YAP1* e o efeito antitumoral de seu inibidor, a verteporfina, na tumorigênese adrenocortical.

MÉTODOS: *Ex vivo* e *in silico*, a expressão do gene *YAP1* em TACs foi analisada a partir de dados públicos disponibilizados nas bases de dados TCGA e GEO, bem como de dados resultantes do RNA-seq de amostras de TACs pediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini. Adicionalmente, o perfil de metilação do gene *YAP1* foi analisado a partir dos dados de amostras de pacientes pediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini e de dados públicos no GEO. *In vitro*, o papel do YAP1 sobre a progressão de TACs foi examinado por meio de ensaios de viabilidade celular, ciclo celular, formação de colônias em ágar mole e invasão celular. A influência de YAP1 sobre a expressão proteica e a atividade transcricional da beta-catenina foi examinada por meio de Western blot, imunofluorescência e qPCR em tempo real. *In vivo*, foi avaliado o efeito da inibição farmacológica do YAP1 usando verteporfina sobre o crescimento tumoral em modelo xenográfico murino de TACs.

RESULTADOS: Houve associação significativa entre a alta expressão de *YAP1* com a menor sobrevida de pacientes pediátricos das coortes GEO e FMRP/USP-Boldrini e de pacientes adultos da coorte TCGA. Ainda, observou-se duas assinaturas de metilação de *YAP1* nas coortes pediátricas avaliadas, sendo que houve associação entre estas assinaturas e o prognóstico dos pacientes da FMRP/USP-Boldrini. Juntos, estes resultados confirmam a importância do gene *YAP1* neste processo. *In vitro*, a inibição do YAP1 reduziu a viabilidade celular através do bloqueio da progressão do ciclo celular na fase G0-G1, inibiu a expressão dos marcadores do processo de transição epitélio-mesênquima, assim como o crescimento independente de ancoragem e a invasão celular. Adicionalmente, o YAP1 modulou os níveis proteicos e a atividade transcricional da beta-catenina e, ao mesmo tempo, a beta-catenina mostrou-se mediadora parcial do efeito do YAP1 nas células adrenocorticais. Finalmente, *in vivo*, a verteporfina inibiu o crescimento tumoral por meio da inibição da proliferação tumoral, demonstrada pela imunorreatividade reduzida de Ki67 nos xenoenxertos de TAC nos animais tratados.

CONCLUSÕES: Nossos achados reforçam o papel do YAP1 como um novo marcador prognóstico para pacientes com TAC, bem como demonstram a contribuição de sua desregulação no processo de tumorigênese adrenocortical. Este estudo evidencia a importância da interação entre as vias Hippo/YAP1 e Wnt/beta-catenina em células adrenocorticais. A demonstração do efeito antitumoral da verteporfina sugere que YAP1 pode ser um novo alvo para o tratamento de pacientes com TAC.

Keywords: Tumor adrenocortical, via Hippo, YAP1, verteporfina, via Wnt/beta-catenina.

Abstract

Bellido More, C. **The role of YAP1 oncogene in tumorigenesis and metastasis process and the effect of its inhibitor verteporfin in pediatrics adrenocortical tumors**. 2022. 144p. Thesis (PhD) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2022.

Background: Adrenocortical tumors (ACT) are rare and aggressive. YAP1, a HIPPO pathway effector, is overexpressed in other types of tumors. Recently, it was shown that *YAP1* overexpression is associated with worse prognosis in pediatric patients with ACT.

Objectives: To evaluate the role of the YAP1 oncogene and the antitumor effect of its inhibitor, verteporfin, in adrenocortical tumorigenesis.

Methods: Ex vivo and in silico, the YAP1 expression in ACT was analyzed from publicly available data from TCGA and GEO databases and the RNA-seq data of pediatric patients' samples from FMRP/USP-Boldrini cohort. In addition, YAP1 methylation profile was analyzed from a methylation array from pediatric patients' samples from FMRP/USP-Boldrini cohort and public data from GEO. In vitro, the role of YAP1 on ACT progression was examined using cell viability, cell cycle, soft-agar colony formation, and cell invasion assays. YAP1's influence on beta-catenin protein levels and transcription activity was examined by immunoblotting, immunofluorescence and real time-qPCR. In vivo, the effect of the pharmacological inhibition of YAP1 by verteporfin on tumor growth was evaluated in a mouse xenograft model of ACT. Results: We confirmed the association between YAP1 mRNA overexpression with impaired survival of pediatric patients from GEO and FMRP/USP-Boldrini cohort and adult patients from TCGA. Moreover, we identified two YAP1 methylation signatures in both pediatric cohorts evaluated. These methylation signatures were also associated with the survival of pediatric patients from the FMRP/USP-Boldrini cohort. Together, these results support the prognostic marker value of YAP1 in ACTs. In vitro, the inhibition of YAP1 reduced adrenocortical cell viability through cell cycle arrestment in G0-G1 phase, inhibited the epithelial mesenchymal transition process markers' expression, as well as anchorage-independent growth and cell invasion. In addition, YAP1 was shown to modulate beta-catenin protein levels and transcription activity and, at the same time, beta-catenin was shown to partially mediate the effect of YAP1 on adrenocortical cells. Finally, in vivo, verteporfin inhibited the tumor growth by inhibiting tumor cell proliferation, as shown by reduced Ki67 immunoreactivity in the xenografts from treated mice.

Conclusions: Our findings reinforce the role of YAP1 as a novel prognostic marker for patients with ACT, as well as demonstrate the mechanisms by which YAP1 deregulation contributes to adrenocortical tumorigenesis. This study also evidences the importance of the crosstalk between

Hippo/YAP1 and Wnt/beta-catenin pathways in adrenocortical cells, which acknowledges YAP1 as a new target for the treatment of patients with ACT.

Keywords: Adrenocortical tumor, Hippo pathway, YAP1, verteporfin, Wnt/beta-catenin pathway

Lista de Siglas e Abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AngII	Angiotensina II
AAC	Adenoma adrenocortical
BSA	Soro Albumina Bovina
CAC	Carcinoma adrenocortical
COG	Children's Oncology Group
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DTT	Diclorodifeniltricloroetano
DVL	Dishvelled
DIN	DNA integrity number
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DAB	3,3'-diaminobenzidina
EMT	Transição epitélio-mesênquima
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumor
ES	Enrichment Scores
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos
FDR	Taxa de falsas descobertas
FFPE	Fixadas em formalina e embebidas em parafina
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GO	Ontologia gênica
GEO	Gene Expression Omnibus
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HR	Taxa de risco
HRP	Horseradish peroxidase
IQR	Intervalo Interquartil
IC	Intervalo de confiança
IPACTR	Registro Internacional de TAC Pediátricos
KEGG	<i>Kyoto</i> Encyclopedia of Genes and Genomes
LFS	Li-Fraumeni
LN	Nódulos linfáticos
NES	Normalized Enrichment Scores
NSG	NOD <i>scid</i> gamma
PBS	Tampão de fosfato salino
OTL	<i>Loci</i> de característica quantitativa
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
RIN	RNA Integrity Number
ROC	Característica de Operação do Receptor
SBF	Soro Bovino Fetal
STR	Short Tandem Repeat
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TPM	Transcritos por milhão
TAC	Tumor adrenocortical
VP	Verteporfina

Lista de Figuras

Figura 1 - Histologia da glândula adrenal
Figura 2 - Representação esquemática da via Hippo-YAP
Figura 3 - Histologia da glândula adrenal de camundongos após <i>knockout</i> para YAP/TAZ39
Figura 4 - Complexo de degradação da beta-catenina
Figura 5 - Sobrevida de pacientes pediátricos com TAC provenientes da coorte FMRP/USP- Boldrini
Figura 6 - Expressão gênica de YAP1 e sobrevida livre da doença de pacientes pediátricos com TAC
Figura 7 - Curvas de sobrevida de pacientes adultos com CAC de acordo com a expressão do RNAm do gene <i>YAP1</i> a partir da base de dados
Figura 8 - Análise de GSEA das três coortes de TAC segundo a expressão do YAP173
Figura 9 - Frequência de mutações em genes relacionados com a via Hippo74
Figura 10 - Perfil de metilação e respectiva expressão do gene <i>YAP1</i> em TACs de pacientes pediátricos provenientes da coorte FMRP/USP-Boldrini
Figura 11 - Sobrevida de pacientes pediátricos com TAC provenientes da coorte FMRP/USP-Boldrini de acordo com o perfil de metilação do gene <i>YAP1</i> 80
Figura 12 - Perfil de metilação do gene <i>YAP1</i> em TACs de pacientes pediátricos provenientes da coorte IPACTR/ GSE131350
Figura 13 - Viabilidade celular após tratamento com verteporfina (VP)83
Figura 14 - Expressão gênica dos genes da via Hippo após tratamento com VP
Figura 15 - Expressão proteica de YAP1 e o YAP1 fosforilado após o tratamento com VP85
Figura 16 - Localização subcelular de YAP1 avaliada por imunofluorescência em células H295R após o tratamento com VP
Figura 17 - Efeito do silenciamento do gene <i>YAP1</i> sob sua expressão gênica e proteica
Figura 18 - Análise de ciclo celular em células H295R após o silenciamento do gene YAP1 88
Figura 19 - Efeito da inibição farmacológica do YAP1 sob a expressão da beta-catenina em células H295R

Figura 20. Efeito do silenciamento do gene YAP1 sob a expressão de beta-catenina e seus alvos em

células H295R
Figura 21 - Redução de DVL após a inibição do YAP191
Figura 22. Efeito do silenciamento do gene <i>CTNNB1</i> na via Hippo em células H295R92
Figura 23. Efeito da inibição do YAP1 sobre a expressão de marcadores mesenquimais93
Figura 24. Ensaio de Invasão celular após a inibição do YAP1 em células H295R94
Figura 25 - Inibição do crescimento independente de ancoragem após inibição do YAP1 em células H295R
Figura 26 - Efeito do tratamento com verteporfina sobre o crescimento tumoral em modelo xenográfico de carcinoma adrenocortical humano
Figura 27 - Efeito do tratamento com VP sobre a histologia dos xenoenxertos da linhagem tumoral adrenocortical H295R
Figura 28 - Efeito do tratamento com VP sobre a proliferação celular dos xenoenxertos da linhagem tumoral adrenocortical H295R

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estadiamento dos TAC em pacientes adultos e sobrevida em 5 anos segundo a classificação da ENSAT
Tabela 2 - Sistemas de estadiamento dos TAC pediátricos proposto por Sandrini e o atualizado pelo IPACTR
Tabela 3 - Características histológicas dos escores propostos por Weiss (1984) por Wieneke <i>et al.</i> (2003) para os TAC em pacientes adultos e pediátricos, respetivamente
Tabela 4 - Características demográficas, clínicas e moleculares dos pacientes pediátricos com TACprovenientes da coorte FMRP/USP-Boldrini
Tabela 5 - Características prognósticas dos pacientes pediátricos com TAC provenientes da coorteFMRP/USP-Boldrini de acordo com a expressão do gene YAP1
Tabela 6 - Características prognósticas dos pacientes adultos com CAC de acordo com a expressão doRNAm do gene YAP1 a partir da base de dados do TCGA
Tabela 7 - Análise multivariada considerando dados clínicos e a expressão do YAP1 dos pacientesadultos com CAC a partir dos dados disponíveis no TCGA
Tabela 8 - Sondas de metilação anotadas ao gene YAP1, sua localização e valores médios de metilaçãonos grupos resultantes da análise de agrupamento não-supervisionado dados dos TACs da coortepediátrica FMRP/USP-Boldrini
Tabela 9 - Características prognósticas dos pacientes pediátricos com TAC provenientes da coorteFMRP/USP-Boldrini de acordo com o perfil de metilação do gene YAP1

Sumário

1. IN	TRODU	ÇÃO			
1.1	Córtex A	Adrenal	27		
1.2	2 Tumores adrenocorticais				
1.3	Epidemi	iologia	29		
1.4	Manifes	tações Clínicas			
1.5	Estadia	mento tumoral			
1.6	Histolog	gia	32		
1.7	Prognós	stico e tratamento	33		
1.8	Genes e	vias envolvidas na tumorigênese dos TACs	34		
1.9	Via Hip	ро е YAP1	36		
1.10) Interaçã	ăo do YAP1 com a via Wnt/beta-catenina	41		
1.11	Justifica	ativa deste estudo	43		
1.12	2 Hipótes	e de trabalho	43		
2. OI	BJETIVO	OS	44		
2.1	Geral		45		
2.2	Específi	icos	45		
3. M	ETODOI	LOGIA	46		
3.1	Coorte	FMRP/USP-Boldrini de pacientes pediátricos com TACs	47		
3.2	Estudo	ex-vivo e in silico	49		
	3.2.1	Análises de transcriptoma tumoral	49		
	3.2.2	Análise de enriquecimento de vias - GSEA	51		
	3.2.3	Análise mutacional	52		
	3.2.4 Análise de Metilação tumoral				
3.3	Estudo	os in vitro	53		
	3.3.1	Cultura de células	53		
	3.3.2	Reagentes	54		
	3.3.2	2.1 Verteporfina (Inibição farmacológica do YAP1)	54		
	3.3.2	2.2 RNA interferente- siRNA (silenciamento gênico)	54		
	3.3.2	2.3 Ensaios TaqMan (avaliação da expressão gênica)	54		
	3.3.2	2.4 Anticorpos (avaliação da expressão proteica)	55		
	3.3.3	Silenciamento gênico	55		
	3.3.4	Ensaio de viabilidade celular	56		
	3.3.5	Ensaio de formação de colônias em ágar mole	56		
	3.3.6	Ensaio de invasão celular	56		
	3.3.7	Ensaio de ciclo celular	57		
	3.3.8	Imunofluorescência.			
	3.3.9	Extração de RNA e PCR quantitativa em tempo real			
2.4	3.3.10	Extração de proteínas e Western blotting			
3.4		S IN VIVO			
	5.4.1	Desenvolvimento do modelo xenografico de carcinoma adrenocortical			
	5.4.2 2.4.2	Ensaio de inibição do crescimento tumoral	60		
	5.4.5 2.4.4	Analise nistologica			
25	J.4.4	riomeração lumoral	01		
 Л ПТ	Analise	rstausuca DOS	02 22		
+. KI	Análiaco	DUD			
4.1	Analises	o uos estudos ex-vivo e in suico	04		

	4.1.1 Características clínicas e sobrevida dos pacientes pediátricos de acordo cor	n a expressão
	do oncogene YAP1	64
	4.1.2 Características clínicas e sobrevida dos pacientes adultos de acordo com a	expressão do
	oncogene YAP1	68
	4.1.3 Análises de enriquecimento de vias	72
	4.1.4 Análise mutacional nos CAC de pacientes adultos	73
	4.1.5 Análise do perfil de metilação tumoral do gene YAP1	75
4.2	Análises dos estudos in vitro	82
	4.2.1 Análise da viabilidade celular após inibição farmacológica do YAP1	82
	4.2.2 Análise da expressão da via Hippo após inibição farmacológica do YAP	
	4.2.3 Análise do ciclo celular após silenciamento do gene YAP1	86
	4.2.4 Análise da interação entre o YAP1 e a via Wnt/beta-catenina	
	4.2.5 Análise de marcadores de transição epitélio-mesênquima	92
	4.2.6 Análise da invasão celular após inibição do YAP1	93
	4.2.7 Análise do crescimento celular independente de ancoragem	94
4.3	Análises dos estudos in vivo	95
	4.3.1 Inibição do crescimento tumoral	95
	4.3.2 Histologia tumoral	97
	4.3.3 Proliferação tumoral	98
5. DI	ISCUSSÃO	100
51	YAP1 é um marcador de pior prognóstico em pacientes com TAC	
0.1	I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	
5.2	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais	103
5.1 5.2 5.3	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP	103 104
5.2 5.3 5.4	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina	103 104 105
5.2 5.3 5.4 5.5	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y	103 104 105 YAP1107
5.2 5.3 5.4 5.5 5.6	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os	103 104 105 YAP1107 marcadores
5.2 5.3 5.4 5.5 5.6	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais	
5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo	103 104 105 YAP1107 marcadores 109 111
5.1 5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. C(Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo	
5.1 5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. CO 7. RI	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo ONCLUSÕES EFERÊNCIAS	
5.1 5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. C0 7. RI 8. AF	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo ONCLUSÕES EFERÊNCIAS PÊNDICES	
5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. CO 7. RI 8. AF A.	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo ONCLUSÕES EFERÊNCIAS PÊNDICES	
5.1 5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. CO 7. RI 8. AP A. pe	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo ONCLUSÕES EFERÊNCIAS PÊNDICES Características demográficas, clínicas, tumorais e moleculares individuais dos ediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini	
5.1 5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. C0 7. R1 8. AP A. pe B.	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo ONCLUSÕES EFERÊNCIAS PÊNDICES Características demográficas, clínicas, tumorais e moleculares individuais dos ediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini	
5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. CO 7. RI 8. AP A. pe B. ex	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo ONCLUSÕES EFERÊNCIAS PÊNDICES Características demográficas, clínicas, tumorais e moleculares individuais dos ediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini Métrica para o valor do ponto de corte nas coortes nas quais foram avaliado spressão do mRNA de YAP1	
5.1 5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. C0 7. R1 8. AP A. pe B. ex 9. A	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo ONCLUSÕES EFERÊNCIAS PÊNDICES Características demográficas, clínicas, tumorais e moleculares individuais dos ediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini Métrica para o valor do ponto de corte nas coortes nas quais foram avaliado spressão do mRNA de YAP1	
5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. C0 7. Rl 8. AF A. pe B. ex 9. A	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo ONCLUSÕES EFERÊNCIAS PÊNDICES Características demográficas, clínicas, tumorais e moleculares individuais dos ediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini Métrica para o valor do ponto de corte nas coortes nas quais foram avaliado spressão do mRNA de YAP1	
5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. C0 7. Rl 8. AP A. pe B. ex 9. A A. B.	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo ONCLUSÕES EFERÊNCIAS PÊNDICES Características demográficas, clínicas, tumorais e moleculares individuais dos ediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini Métrica para o valor do ponto de corte nas coortes nas quais foram avaliado spressão do mRNA de YAP1 NEXOS Ofício de aprovação de uso de camundongos	
5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. C0 7. Rl 8. AP A. pe B. ex 9. A A. B.	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo ONCLUSÕES EFERÊNCIAS PÊNDICES Características demográficas, clínicas, tumorais e moleculares individuais dos ediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini Métrica para o valor do ponto de corte nas coortes nas quais foram avaliado spressão do mRNA de YAP1 NEXOS Ofício de aprovação de uso de camundongos Ofício de aprovação de uso de camundongos	
5.2 5.3 5.4 5.5 5.6 1 5.7 6. C0 7. Rl 8. AF A. pe B. ex 9. A 8. 4. 5.7 6. C0 7. Rl 8. AF 8. 4. 5.7 6. 5.7 7. Rl 8. 4. 7. 8. 8. 8. 7. 8. 8. 8. 9. 9. 8. 7. 8. 7. 8. 7. 7. 7. 8. 7. 7. 8. 8. 8. 8. 8. 8. 7. 8. 7. 8. 8. 8. 8. 8. 8. 8. 8. 8. 8. 8. 8. 8.	Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt/beta-catenina Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do Y Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os mesenquimais Inibição do crescimento tumoral in vivo ONCLUSÕES EFERÊNCIAS PÊNDICES Características demográficas, clínicas, tumorais e moleculares individuais dos ediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini Métrica para o valor do ponto de corte nas coortes nas quais foram avaliado cpressão do mRNA de YAP1 NEXOS Ofício de aprovação de uso de camundongos Ofício de aprovação de uso de camundongos Ofício de aprovação de uso de camundongos	

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Córtex Adrenal

As glândulas adrenais são órgãos bilaterais localizados acima dos rins e participam da regulação hormonal de diversas funções fisiológicas vitais, incluindo resposta imune, resposta ao estresse, homeostase energética, maturação sexual e equilíbrio hidrossalino. As adrenais são compostas por dois compartimentos histológicos e funcionalmente diferentes: o córtex adrenal, que produz esteroides, e a medula, que secreta catecolaminas (Figura 1) (ANTONINI; STECCHINI; RAMALHO, 2020; PIGNATTI; FLÜCK, 2021).

O córtex adrenal é derivado de células do mesoderma intermediário e se origina a partir dos 28-30 dias após a concepção, entre o epitélio celômico e a aorta dorsal (HATANO et al., 1996; PIGNATTI; FLÜCK, 2021). A partir da 8ª semana de gestação, o córtex adrenal rudimentar já está conformado por uma camada interna, chamada zona fetal (zFt) e uma camada externa recém formada, chamada zona definitiva (zD). Apenas após a metade da gestação desenvolve-se uma terceira camada, a zona de transição (zT), que é derivada da zD e se localiza entre as zFt e zD (ANTONINI; STECCHINI; RAMALHO, 2020).

O peso da glândula adrenal humana em desenvolvimento aumenta quase 10 vezes entre a 8ª e a 10ª semanas após a concepção. A adrenal fetal continua crescendo durante a gestação e por volta das 30 semanas atinge um tamanho equivalente a 10 a 20 vezes o da glândula adrenal adulta. Ao nascimento, o peso da adrenal é de 8 a 10 g, que é o dobro do peso das adrenais adultas, mas diminui para cerca de 2 g durante as primeiras 2 semanas de vida pós-natal. Esta rápida involução deve-se ao desaparecimento da zFt pelo processo de apoptose. Como consequência, o peso total das glândulas diminui em aproximadamente 50% (ANTONINI; STECCHINI; RAMALHO, 2020; ISHIMOTO; JAFFE, 2011).

A glândula adrenal humana continua a sofrer remodelação significativa durante os períodos neonatal e puberal. As zonas zD e zT formam o córtex adrenal adulto. A zona glomerulosa (zG) e a zona fasciculata (zF) — que podem começar a se diferenciar durante o período pré-natal tardio ou mesmo após o nascimento — proliferam e amadurecem por volta dos 2-3 anos de idade por influência dos hormônios angiotensina II (AngII) e ACTH,

respectivamente. A zona reticular (zR), formada entre a zF e a medula, aparece apenas aos 6-8 anos de idade nas meninas e 7-9 anos nos meninos. Este evento caracteriza a adrenarca (ANTONINI; STECCHINI; RAMALHO, 2020; XING et al., 2015).

1.2. Tumores adrenocorticais

Os tumores adrenocorticais (TACs) são neoplasmas que se apresentam em diferentes idades, mas são mais comuns durante a primeira e a quinta décadas de vida (pico bimodal). Os TACs são geralmente unilaterais, podendo ser funcionantes (secreção autônoma de esteróides), especialmente nas crianças, ou não-funcionantes, predominantemente em adultos. A maioria destes tumores são adenomas adrenocorticais (AAC) benignos, que apresentam prognóstico favorável. Por outro lado, os tumores malignos são chamados de carcinomas adrenocorticais (CAC), que são raros e têm prognóstico desfavorável (FASSNACHT; KROISS; ALLOLIO, 2013; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005).



Figura 1. Histologia da glândula adrenal.

Comparação da histologia e zoneamento anatômico da glândula adrenal (**A**) fetal e (**B**) adulta (Adaptado de: Monticone, Auchus e Rainey; 2012).

1.3. Epidemiologia

Os TACs afetam entre 3 e 10% da população mundial, sendo a maioria dos tumores AAC (MANSMANN et al., 2004). Os CACs têm baixa incidência, entre 0,7 a 2 casos por milhão por ano em pacientes adultos, sendo mais frequentes em mulheres (55-60%). Aproximadamente 60% dos casos são diagnosticados entre os 40 a 70 anos de idade. Em indivíduos diagnosticados com menos de 20 anos de idade, os CACs também são raros, apresentando incidência de 0,2 a 0,3 casos por milhão por ano, o que representa 0,2% de todos os carcinomas neste grupo etário (CLAY et al., 2022; KERKHOFS et al., 2013; LEAL et al., 2011; MCATEER; HUACO; GOW, 2013; PINTO; ZAMBETTI; RODRIGUEZ-GALINDO, 2020; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005; WAJCHENBERG et al., 2000). Porém, existe diferença geográfica importante na incidência de TAC, pois no Sul e Sudeste do Brasil a mesma pode ser até 15 vezes maior que a relatada em outros países, chegando a 4,2 casos por milhão (LATRONICO et al., 2001; RIBEIRO et al., 2001; RIBEIRO; FIGUEIREDO, 2004).

1.4. Manifestações Clínicas

A principal queixa apresentada em 40% a 60% dos pacientes com TAC está relacionada com o excesso de secreção hormonal pelo córtex adrenal. Adicionalmente, boa parte dos pacientes apresenta sintomas mais inespecíficos, como dor abdominal, que estão relacionados ao crescimento tumoral local. A síndrome de Cushing é a apresentação mais comum dos pacientes adultos que apresentam hipersecreção hormonal. Entre 50% a 80% dos pacientes adultos com CACs funcionantes apresentam hipercortisolismo. Já nos pacientes pediátricos, a virilização decorrente do excesso de hormônios androgênios é a manifestação clínica mais comum, principalmente devido à secreção autônoma tumoral de grandes quantidades de sulfato de dehidroepiandrosterona (S-DHEA) (ANTONINI et al., 2011; ELSE et al., 2014; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005). Existem também tumores que secretam androgênios e cortisol, sendo desta forma considerados tumores mistos. Esta forma é a mais comum nos pacientes pediátricos (ELSE et al., 2014). Raramente os TACs apresentam secreção de aldosterona ou estrógenos (ANTONINI et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012).

1.5. Estadiamento tumoral

O estadiamento tumoral é uma das ferramentas de avaliação do prognóstico mais importantes para pacientes com câncer. Atualmente, para o estadiamento dos TACs em pacientes adultos é amplamente usada a classificação TNM proposta pela *European Network for the Study of Adrenal Tumor* (ENSAT), que inclui o tamanho e extensão do tumor (T), número de linfonodos próximos (N) e presença de metástase (M) (**Tabela 1**) (FASSNACHT; ALLOLIO, 2009; LUGHEZZANI et al., 2010).

Estágio tumoral	Classificação ENSAT	Sobrevida em 5 anos
Ι	T1 N0 M0	82% (95% IC, 69-99)
II	T2 N0 M0	61% (95% IC, 51-69)
III	T1-2 N1 M0	50% (95% IC, 39-61)
	T3-4 N0-1 M0	
IV	T1-4 N0-1 M1	13% (95% IC, 5-21)

Tabela 1. Estadiamento dos TAC em pacientes adultos e sobrevida em 5 anos segundo aclassificação da ENSAT

Fonte: Fassnacht e Allolio (2009), Lughezzani et al. (2010).

Para o estadiamento dos TAC pediátricos, o sistema proposto por Sandrini *et al.* (1997) é o mais usado (SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997) (Tabela 2) e vem sendo modificado pelo *Children's Oncology Group* (COG) (Tabela 2), a partir dos dados clínicos obtidos pelo *International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry* (IPACTR). Este registro contempla informações de pacientes pediátricos diagnosticados com TAC ao redor de todo o mundo, o que permite uma curadoria globalizada sobre a biologia da doença e a padronização dos critérios diagnósticos e terapêuticos. O IPACTR propõe a estratificação dos pacientes a partir de seu prognóstico, a fim de identificar aqueles que devem receber terapia mais intensiva; contudo, não considera a idade do paciente ao diagnóstico, que é sabidamente associado à sua sobrevida (MICHALKIEWICZ et al., 2004; PINTO; ZAMBETTI; RODRIGUEZ-GALINDO, 2020).

 Tabela 2. Sistemas de estadiamento dos TAC pediátricos proposto por Sandrini e o atualizado pelo IPACTR

Estádio	Sandrini	IPACTR
tumorai		
Ι	Tumor totalmente ressecado, volume	Tumor completamente ressecado
	tumoral <200 cm, ausência de metástase,	com margens negativas, peso
	níveis hormonais normais após a cirurgia.	tumoral ≤200 g, ausência de
		doença metastática.
II	Tumor residual microscópico, volume	Tumor completamente ressecado com
	tumoral >200 cm, rompimento da cápsula e	margens negativas, peso >200 g, ausência de
	disseminação do tumor durante a cirurgia,	doença metastática.
	ou persistência de níveis hormonais	
	anormais após a cirurgia.	
III	Tumor residual grosseiro ou inoperável.	Tumor residual (definido pela presença de
		tumor microscópico ou massa tumoral após
		a ressecção cirúrgica) ou inoperável.
IV	Metástase à distância.	Metástase hematogênica na apresentação.

Fonte: Pinto, Zambetti e Rodriguez-Galindo (2020).

1.6. Histologia

A avaliação patológica nos TACs de pacientes adultos se baseia no escore de Weiss, publicado no ano de 1984 (WEISS, 1984), sendo o sistema mais comumente aceito e adotado pela Organização Mundial de Saúde. Este escore consiste na avaliação de nove características histopatológicas (**Tabela 3**), sendo que a presença de menos de três destas estão relacionadas com comportamento benigno e, pelo contrário, a presença de três ou mais destas características está associada ao comportamento maligno (LAU; WEISS, 2009).

Para os TACs pediátricos, não existe uma clara diferenciação histológica entre adenomas e carcinomas, sendo difícil sua classificação patológica (PINTO; ZAMBETTI; RODRIGUEZ-GALINDO, 2020; WIENEKE; THOMPSON; HEFFESS, 2003). Atualmente, o critério proposto por Wieneke *et al.* (2003) é mais aceito (**Tabela 3**) para a avaliação de risco dos TAC pediátricos. Este modelo que é semelhante ao escore de Weiss também avalia nove características histológicas, sendo que a presença de até duas características indica tumores benignos ou AACs, a presença de três características indica tumor com potencial de

malignidade incerta e quatro ou mais presentes características indicam comportamento maligno ou CACs (WIENEKE; THOMPSON; HEFFESS, 2003).

Tabela	3.	Característi	cas hi	istológicas	dos	escores	propostos	por	Weiss	(1984)	e]	por
Wienek	ke ei	<i>t al.</i> (2003) pa	ara os	TAC em p	acie	ntes adu	ltos e pediá	trico	s, respe	etivame	nte	;

Escore de Weiss	Escore de Wieneke
Grau nuclear elevado	• Peso tumoral > 400 gramas
• > 5 mitoses / 50 campos de alta resolução	• > 15 mitoses / 20 campos de alta resolução
(400x)	(400x)
Mitoses atípicas	• Figuras mitóticas atípicas
• <25% de células claras	• Diâmetro tumoral > 10,5 cm
• >33% de arquitetura difusa	• Extensão para tecidos moles periadrenais e /
• Necrose tumoral	ou órgãos adjacentes.
• Invasão venosa	Necrose tumoral
• Invasão sinusoidal	• Invasão venosa
• Infiltração capsular	• Invasão da veia cava inferior
	Invasão capsular

Fonte: Weiss (1984) e Wieneke, Thompson e Heffess (2003)

1.7. Prognóstico e tratamento

A remoção cirúrgica total do tumor permanece a única opção terapêutica potencialmente curativa ou que prolonga a sobrevida de pacientes diagnosticados com TAC em estágios I a III (MICHALKIEWICZ et al., 2004).

Em pacientes adultos tem sido usado o composto adrenotóxico mitotano, que é derivado do inseticida diclorodifeniltricloroetano (DTT) e é a única droga aprovada pela FDA para o tratamento dos TACs. O mitotano é usado como agente único na terapia adjuvante após a ressecção completa do tumor (FASSNACHT; KROISS; ALLOLIO, 2013; KHORRAM-MANESH et al., 1998; TERZOLO et al., 2014). O mitotano tem efeito sobre a esteroidogênese adrenal, o que pode ser devido a inibição da transcrição de genes codificadores de enzimas esteroidogênicas (PUGLISI et al., 2020). Alguns estudos mostram que o mecanismo pelo qual o mitotano afeta a esteroidogênese é sua interferência na atividade da cadeia respiratória mitocondrial, uma vez que induz a perda de função da enzima citocromo c oxidase (COX) nas células adrenocorticais e a fragmentação morfológica das membranas mitocondriais

(BEDROSE et al., 2020; HESCOT et al., 2013). Há pouca informação sobre o uso do mitotano em pacientes pediátricos, ainda que alguns estudos mostram resultados semelhantes aos de pacientes adultos (MICHALKIEWICZ et al., 2004; RIBEIRO et al., 2012; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005). Os dados do maior estudo prospectivo nesta área, o protocolo COG ARAR 0332, confirmaram que o mitotano associado ao esquema quimioterápico convencional composto por cisplatina, etoposídeo e doxirrubicina parece contribuir positivamente no aumento da sobrevida de pacientes em estágio tumoral IPACTR III. Este mesmo estudo confirmou que uma das maiores dificuldades do uso do mitotano são seus efeitos adversos e o risco de toxicidade. Cerca de um terço dos pacientes pediátricos neste esquema de tratamento composto por mitotano e quimioterapia não conseguiram completar o tratamento em função de efeitos colaterais (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2021).

Os TACs em estágio avançado ou metastático são considerados de prognóstico desfavorável e as opções terapêuticas são limitadas. Apesar de diferentes fatores de risco terem sido identificados, os mecanismos envolvidos na tumorigênese adrenocortical precisam ser melhor elucidados (ASSIÉ et al., 2014; LIPPERT et al., 2018; ZHENG et al., 2016). Assim, faz-se necessária a identificação de novos alvos e terapias para pacientes com doença avançada ou recidiva (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2021).

1.8. Genes e vias envolvidas na tumorigênese dos TACs

Dada a sua raridade, de modo geral o tamanho reduzido das casuísticas estudada até agora não favorece o entendimento completo dos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento do CAC e a identificação de marcadores de pior prognóstico. Todo o conhecimento acumulado até o presente demonstra que os CACs são o resultado de desregulações nos processos de diferenciação celular, proliferação não-verificada e ativação de receptores hormonais e de fatores de crescimento, além de outros (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005).

p53

O gene mais fortemente associado aos TACs é o *TP53*. O *TP53* é um gene supressor tumoral e a presença de mutações de perda de função neste gene contribui significativamente para o desenvolvimento tumoral. No caso dos TACs, se observam mutações somáticas no gene TP53 em 25% dos tumores esporádicos em adultos e mutações germinativas em pelo menos 50% dos TACs pediátricos (LIBÈ; FRATTICCI; BERTHERAT, 2007; REINCKE et al., 1994; WAGNER et al., 1994). A variante germinativa p53 p.R337H encontra-se com frequência no Sul e Sudeste do Brasil, sendo sua prevalência igual ou superior a 78% nos pacientes pediátricos diagnosticados com TAC provenientes destas regiões. Esta variante apresenta baixa penetrância. Sua presença está associada a prognóstico desfavorável em pacientes adultos, mas não nos pediátricos, apesar de ser mais prevalente neste grupo (LATRONICO et al., 2001; WASSERMAN et al., 2015). Análises de marcadores polimórficos intragênicos demonstraram que a mutação p53 p.R337H é originária de um único fundador (PINTO et al., 2004). Estudos estruturais têm demonstrado que a substituição da arginina (R) pela histidina (H) no resíduo 377 da p53 interrompe a estabilização de uma ponte salina no domínio de tetramerização da proteína p53, ocorrendo de forma pH-dependente (DIGIAMMARINO et al., 2002). Esta mutação resulta em atividade semelhante à da proteína selvagem em ensaios in vitro, o que estaria relacionado com a diminuta frequência desta mutação em pacientes com Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) (WASSERMAN et al., 2015). Recentemente, um estudo usando um modelo murino demonstrou que a mutação germinativa p53 p.R337H é menos prejudicial à atividade supressora tumoral e está associada à maior vida útil da proteína p53 quando comparada a outras mutações encontradas no sítio de ligação ao DNA e que são claramente associadas com a LFS (JEFFERS et al., 2021).

Wnt/Beta-Catenina

Uma das principais vias envolvidas na patogênese dos TACs é a via Wnt/beta-catenina. Esta via encontra-se ativa em diversos tipos de câncer humanos, incluindo os TACs (TISSIER et al., 2005). A sinalização canônica desta via depende do ligante Wnt para sua ativação e subsequente translocação da beta-catenina do citoplasma ao núcleo celular. Uma vez no núcleo, a beta-catenina interage com os fatores de transcrição Tcf/Lef permitindo a expressão de seus genes alvo (EL WAKIL; LALLI, 2011; HE et al., 1998; TETSU; MCCORMICK, 1999). O exon 3 do gene *CTNNB1*, codificador da beta-catenina, encontra-se frequentemente mutado nos TACs. Estas mutações somáticas levam ao ganho de função da via, pois resultam na perda da fosforilação de um dos domínios específicos ricos em serina ou treonina, o que bloqueia a degradação da beta-catenina. O resultado é o acúmulo de beta-catenina no citoplasma e sua consequente translocação ao núcleo, permitindo que beta-catenina ative os fatores de transcrição e induza a expressão de genes tumorais como *CCND1*, *MYC* e *AXIN2* (TADJINE
et al., 2008; TISSIER et al., 2005). Estas mutações somáticas ativadoras no gene *CTNNB1* foram observadas em 15 a 36% e em 6% dos TACs adultos e pediátricos, respectivamente (BONNET et al., 2011; GAUJOUX et al., 2013; LEAL et al., 2011; MERMEJO et al., 2014; TADJINE et al., 2008; TISSIER et al., 2005).

A ativação excessiva da beta-catenina está associada a prognóstico desfavorável tanto de pacientes adultos quanto pediátricos com TAC (GAUJOUX et al., 2013; LEAL et al., 2011; MERMEJO et al., 2014). Estudos realizados por nosso grupo demonstraram que as mutações no gene *CTNNB1* são menos frequentes em TACs pediátricos do que em adultos. Contudo, sua presença está associada ao pior prognóstico dos pacientes pediátricos (LEAL et al., 2011; MERMEJO et al., 2014; BUENO et al., 2022).

Adicionalmente, outras mutações na via Wnt foram observadas em TACs, como mutações nos genes *ZNRF3* e *APC*, que também estão associadas ao acúmulo nuclear de betacatenina (ASSIÉ et al., 2014; LIPPERT et al., 2018; ZHENG et al., 2016). No entanto, a frequente ativação da via Wnt/Beta-catenina nos TACs, independentemente da identificação de mutações, sugere que outras alterações estejam envolvidas (LEAL et al., 2011).

Recentemente, Borges et al. demonstraram por meio de um modelo murino transgênico que a combinação da ativação da via Wnt/beta-catenina e a desregulação da via p53/RB1 foi suficiente para resultar na formação de TACs. Este dado reforça ainda mais que a via p53/RB1 tem interface com a Wnt/beta-catenina na promoção da tumorigênese adrenocortical (BORGES et al., 2020).

1.9. Via Hippo e YAP1

A via Hippo é uma via celular conservada que foi primeiramente descrita na *Drosophila sp*. Esta via regula a proliferação celular e apoptose, estando envolvida na regeneração e no tamanho dos órgãos, na diferenciação celular e na homeostase dos tecidos (AVRUCH; ZHOU; BARDEESY, 2012; CAMARGO et al., 2007). Em condições fisiológicas, a via Hippo atua como um supressor da função do seu efetor *yes-associated protein-1* (YAP1), mantendo assim a quiescência de células-mãe e suprimindo a proliferação celular. Porém, mediante dano tecidual, a via Hippo é reprimida e o YAP1 é ativado, promovendo a auto renovação das células-mãe e proliferação celular, permitindo sua reparação (SZULZEWSKY et al., 2020; WANG et al., 2018).

A via Hippo e o YAP1 têm sido associados com a tumorigênese. A desregulação do YAP1 tem sido associada ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer e ao prognóstico desfavorável dos pacientes (AVRUCH; ZHOU; BARDEESY, 2012; FERNANDEZ-L et al., 2009; ZHANG et al., 2011). Os principais componentes da via Hippo são as quinases centrais MST1/2 e LATS1/2, e respectivos efetores à jusante YAP1/TAZ (Figura 2). Essa via pode ser regulada por meio da interação celular, do estresse mecânico e de outros mecanismos. Quando ativa, a via Hippo induz uma cascata de fosforilação dos componentes das quinases centrais que fosforilam YAP1 no resíduo Ser127, induzindo sua retenção citoplasmática e degradação proteossomal. Ao contrário, quando a via Hippo está inativa, o YAP1 se transloca para o núcleo celular, onde interage com o fator de transcrição TEAD (domínio TEA) e induz a expressão de genes-alvo envolvidos na proliferação celular e tumorigênese, como *CTGF* e *CYR61* (ZHAO et al., 2007, 2008). Assim, a atividade do YAP1 depende de seu estado de fosforilação e localização subcelular.



Figura 2. Representação esquemática da via Hippo-YAP.

Adaptado de: Szulzewsky et al. (2021).

A superexpressão de YAP1, incluindo seu acúmulo nuclear, foi descrita em diferentes tipos de câncer e está relacionada com o pior prognóstico dos pacientes (DEY; VARELAS; GUAN, 2020; POMA *et al.*, 2018). Nosso grupo demonstrou que o YAP1 pode ser encontrado no núcleo celular e que sua superexpressão está associada a menor sobrevida de pacientes pediátricos com TACs (ABDUCH *et al.*, 2016).



Figura 3. Histologia da glândula adrenal de camundongos após *knockout* para YAP/TAZ.

Caspase 3 clivada

Fotomicrografias demonstrando a histologia da glândula adrenal de camundongos machos $Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{Cre/+}$ e seu controle $Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{Cre/+}$ após (A) 20 semanas e (B) 30 semanas de vida. (C) Marcação positiva da caspase-3 em animais $Yap^{flox/flox};Taz^{flox/flox};Nr5a1^{Cre/+}$ com 20 semanas de vida. Adaptado de: Levasseur *et al.* (2017).

Até a publicação do estudo supracitado, a importância do YAP1 e da via Hippo no córtex adrenal não havia sido descrita. Contudo, em 2017 um grupo de pesquisadores canadense avaliou os efetores da via Hippo — YAP e TAZ — no desenvolvimento do córtex adrenal. Para isso, foi gerado um modelo murino transgênico, utilizando-se a deleção condicional dos

mesmos em células esteroidogênicas pelo sistema de recombinação sítio-específica *Cre-Lox*. Os autores observaram que a deleção do YAP1 formou numerosas células vacuoladas e estruturas lipoides longas multinucleadas em camundongos machos de 20 semanas de vida (**Figura 3A**), enquanto que a organização do córtex adrenal foi quase totalmente prejudicada (**Figura 3B**) após 30 semanas de vida. Estes dados demonstraram o papel do YAP1 na manutenção do córtex adrenal normal em camundongos machos. Adicionalmente, foi avaliada a expressão da caspase-3 após a deleção de YAP/TAZ nas células adrenais e observou-se a degeneração da glândula adrenal mediada pelo processo de apoptose (**Figura 3C**) (LEVASSEUR *et al.*, 2017).

A proteína YAP1 também tem sido relacionada com os processos de iniciação, progressão e metástase tumoral (THOMPSON, 2020; ZANCONATO; CORDENONSI; PICCOLO, 2016). Especificamente no processo de metástase, um estudo avaliou o processo de metástase nos linfonodos, que é um marcador sensível para predizer a disseminação tumoral para órgãos distantes e o prognóstico do paciente. Usando modelos animais nos quais implantaram células de melanoma, os autores avaliaram o tumor primário, metástases-linfonodais e metástase distante no pulmão. Observou-se que a ativação do metabolismo de oxidação de ácidos graxos é necessária para a ativação do crescimento de células tumorais metastáticas drenadas nos linfonodos, e que esta seria dependente da ativação do YAP1. Adicionalmente, foi observada a ativação do YAP1 em células que se encontram na frente invasiva nos tumores metastáticos-linfonodias de melanoma e em tumores metastáticos-linfonodias de modelo de câncer de mama. Já nos tumores primários e metastáticos no pulmão não foi evidenciada a ativação do YAP1 (LEE et al., 2019).

Verterporfina

Estudos *in vitro* destacaram a importância do YAP1 no processo de tumorigênese de cólon, de ovário e glioma (HUA et al., 2016; PARK; JEONG, 2015; WANG et al., 2017). Acredita-se que a interação YAP1-TEAD seja o alvo-terapêutico mais direto para suprimir o crescimento tumoral induzido por YAP1.

A verteporfina (VP) é um inibidor da interação YAP1-TEAD (LIU-CHITTENDEN *et al.*, 2012) e é um medicamento aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulatório de medicamentos dos Estados Unidos, para o tratamento da degeneração macular.

Por esta razão, a VP tem sido considerada uma droga promissora para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo mama, próstata, esôfago e adenocarcinoma ductal pancreático (CHEN *et al.*, 2014; DONOHUE *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2014). Estudos recentes demonstraram que o efeito da VP sobre a inibição da transcrição do gene *YAP1* é uma propriedade independente da ativação pela luz. Isto é importante porquê, quando exposta a luz, a VP induz a formação de oligômeros e complexos proteicos de alto peso molecular que podem resultar em toxicidade celular (KONSTANTINOU et al., 2017). Neste sentido, salienta-se a importância do cuidado com o controle da luz durante todas as etapas ao se estudar as propriedades não ativadas por luz da VP.

1.10. Interação do YAP1 com a via Wnt/beta-catenina

Existem vários relatos que demonstram a interação entre as vias Wnt/beta-catenina e Hippo/YAP1. Um destes primeiros estudos demonstrou que TAZ se une a proteína *scaffold Dishevelled* (DVL). A DVL, por sua vez, se une ao receptor *Frizzled* quando a via Wnt é ativada, sendo que a união entre DVL e TAZ inibe esta interação, bloqueando a ativação da via Wnt (VARELAS et al., 2010). Imajo *et al.* (2012), mostraram que YAP1 também se une à DVL, ajudando a inibir a beta-catenina. Adicionalmente, mostraram que YAP1 se une diretamente à beta-catenina no citoplasma, bloqueando assim sua translocação nuclear (IMAJO *et al.*, 2012). Posteriormente, demonstrou-se que YAP/TAZ se associam ao complexo de degradação da beta-catenina (**Figura 4**). Desta forma, mediante a ativação da via pelo ligante Wnt, ocorre a liberação do YAP1 citoplasmático do complexo de degradação, o que permite sua translocação ao núcleo e ativação da transcrição de seus genes-alvo (AZZOLIN et al., 2014). Por outro lado, o trabalho de Konsavage *et al.* (2012) demonstrou que a beta-catenina pode regular positivamente a transcrição de *YAP1* em carcinoma colorectal (KONSAVAGE et al., 2012).



Figura 4. Complexo de degradação da beta-catenina.

Modelo da formação do complexo de degradação da beta-catenina onde participa YAP/TAZ (Adaptado de: Azzolin *et al.*,2014).

Outros estudos demonstraram a interação entre a beta-catenina e o YAP1 no núcleo celular, o que permitiria a transcrição de genes-alvo em comum. No trabalho de Deng *et al.* (2018), os autores demonstraram que, em um tipo de carcinoma colo-retal associado à colite, o YAP1 se associa à beta-catenina e ao fator de transcrição TCF para ativar a transcrição de genes codificadores da Ciclina D1 e o Lgr5 (DENG *et al.*, 2018). Recentemente, demonstrou-se que, em células de câncer de mama do tipo basal, YAP1, beta-catenina e TEAD se associam no núcleo celular para induzir a expressão de genes-alvo como *AXIN* e *NUAK*, sendo este último recentemente identificado como alvo de YAP1 (QUINN *et al.*, 2021). Adicionalmente, neste mesmo trabalho evidenciou-se que YAP1 é necessário para a translocação da beta-catenina ao núcleo (QUINN *et al.*, 2021). Juntos, estes trabalhos evidenciam que as vias Hippo/YAP e

Wnt/beta-catenina interagem, tanto em nível citoplasmático quanto nuclear, e que existe uma regulação entre ambas que pode se dar por diversos mecanismos, os quais provavelmente sejam contexto-dependente.

1.11. Justificativa deste estudo

O envolvimento do YAP1 na tumorigênese adrenocortical permanece pouco compreendido. Como detalhado acima, de nosso conhecimento, há apenas um estudo do nosso grupo demonstrou que o aumento da expressão do YAP1 se associa com pior prognóstico em crianças com TAC. Adicionalmente, a outra única demonstração da importância do YAP1 no córtex adrenal foi a demonstração de seu papel crucial durante a embriogênese.

1.12. Hipótese de trabalho

Dessa forma, a hipótese deste estudo é que o oncogene *YAP1* exerce um papel importante nos processos de crescimento tumoral e metástase dos TACs, cuja função vai depender de seu estado de fosforilação e também de seu papel regulador da via Wnt/beta-catenina. Logo, a inibição do YAP1 pode resultar em efeitos antitumorais nos TACs.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Avaliar o envolvimento do oncogene YAP1 e sua interação com a via Wnt/beta-catenina na tumorigênese adrenocortical e nos processos relacionados com o desenvolvimento de metástases.

2.2. Específicos:

- Avaliar, *ex vivo* e *in silico*, a expressão do gene *YAP1* nos TACs de duas coortes de pacientes pediátricos e nos CACs de uma coorte de pacientes adultos e sua associação com características clínicas e prognósticas.
- Avaliar, *in vitro*, o efeito da interação da via Hippo/YAP com a via Wnt/beta-catenina na tumorigênese adrenocortical usando a linhagem celular de tumor adrenocortical H295R.
- Avaliar, *in vitro*, o efeito da inibição do YAP1 por silenciamento ou tratamento farmacológico, no processo de crescimento tumoral e transição epitélio-mesênquima na linhagem H295R.
- Avaliar, *in vivo*, o efeito da inibição farmacológica do YAP1 pela VP no crescimento de tumores derivados da linhagem celular H295R em modelo xenográfico murinho.

3. Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1. Coorte FMRP/USP-Boldrini de pacientes pediátricos com TACs

A casuística da coorte de TACs de pacientes pediátricos FMRP/USP-Boldrini faz parte do estudo transversal "Mecanismos fisiopatológicos e moleculares da tumorigênese adrenocortical: abordagem baseada em plataformas de sequenciamento em escala genômica (NGS - *Next-generation sequencing*)" pertencente ao Projeto Temático fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo 14/03989-6) desenvolvido por nosso grupo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP-USP (#5856/2013) e do Centro Infantil Boldrini (#1.7-050809) e os pacientes foram incluídos mediante assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por seus pais ou responsáveis.

A casuística envolve dados clínico-patológicos e amostras de TACs primários que foram submetidos ao sequenciamento de RNA (RNA-Seq ou transcriptoma) e/ou análise de perfil de metilação tumoral (metiloma). Estas amostras são provenientes de 69 pacientes pediátricos (idade ao diagnóstico < 18 anos), acompanhados entre 1991 e 2019, nos dois centros universitários de referência no Estado de São Paulo - Sudeste do Brasil: FMRP-USP (n=38) e Centro Infantil Boldrini (n=31). As características demográficas, clínicas e moleculares dos pacientes foram obtidas de nossa base de dados e estão resumidas na **Tabela 4** e detalhadas no **APÊNDICE A**.

Resumidamente, a avaliação diagnóstica e o acompanhamento dos pacientes foram realizados conforme descrito por Antonini, Leal e Cavalcanti (2014) (ANTONINI, LEAL, CAVALCANTI, 2014). O estadiamento tumoral foi realizado de acordo com a classificação atualizada do IPACTR e o tratamento dos pacientes de acordo com o protocolo COG ARAR0332 (RIBEIRO et al., 2012; RODRIGUEZ-GALINDO C et al. 2021). O diagnóstico histopatológico foi realizado utilizando-se o critério proposto por Wieneke (WIENEKE, THOMPSON, HEFFESS, 2003). As mutações p53 p.R337H (germinativa) e no éxon 3 do gene *CTNNB1* (somáticas) foram genotipadas por sequenciamento direto automatizado de Sanger, conforme descrito previamente (LEAL et al. 2011, MERMEJO et al. 2014).

Característica	Total	Transcriptoma	Metiloma	
Pacientes, n (%)	69 (100)	50 (72)	59 (85)	
Procedência, n (%)				
FMRP-USP	38 (55)	23 (46)	38 (64)	
Centro Infantil Boldrini	31 (45)	27 (54)	21 (36)	
Sexo, n (%)				
Feminino	48 (70)	34 (68)	42 (71)	
Masculino	21 (30)	16 (32)	17 (29)	
Idade ao diagnóstico (anos)				
Mediana	1,9	1,6	2	
IQR	1,2-3,7	1,2-2,9	1,4 – 3,8	
< 4 anos	53 (87)	43 (86)	45 (76)	
>4 anos	16 (23)	7 (14)	14 (24)	
Apresentação clínica, n (%)				
Assintomática	10 (14)	7 (14)	7(12)	
Sd. de Cushing	6 (9)	2 (4)	6 (10)	
Virilização	51 (74)	40 (80)	45 (76)	
Virilização e Sd. de Cushing	2 (3)	1 (2)	1 (2)	
Estágio tumoral (IPACTR), n (%)				
Ι	37 (54)	27 (54)	33 (56)	
II	15 (22)	11 (22)	15 (24)	
III	10 (14)	9 (18)	5 (8)	
IV	7 (10)	3 (6)	6 (10)	
Diagnóstico histopatológico (Wieneke), n (%)				
Adenoma	28 (41)	22 (44)	25 (42)	
Malignidade incerta	16 (23)	12 (24)	14 (24)	
Carcinoma	20 (29)	12 (24)	16 (27)	
Não avaliados	5 (7)	4 (8)	4 (7)	
Recidiva pós-cirúrgica, n (%)				
Não	58 (84)	45 (90)	47 (80)	
Sim	12 (16)	5 (10)	12 (20)	

Tabela 4. Características demográficas, clínicas e moleculares dos pacientes pediátricos com TAC provenientes da coorte FMRP/USP-Boldrini

Mutação germinativa p53 p.R	337H			
Sim	59 (86)	43 (86)	51 (86)	
Não	5 (7)	2 (4)	5 (8)	
Não avaliados	5 (7)	5 (10)	3 (6)	
Mutação somática CTNNB1 (éxon 3), n (%)				
Sim	7 (10)	2 (4)	7 (12)	
Não	53 (77)	39 (78)	48 (81)	
Não avaliados	9 (13)	9 (18)	4 (7)	
Seguimento (meses)				
Mediana	64,8	60,6	52,8	
IQR	19,2 – 108	21,3 - 108	16,8-92,8	
Desfecho, n (%)				
Doença em remissão	52 (75)	40 (80)	43 (73)	
Doença ativa	3 (5)	2 (4)	3 (5)	
Óbito	10 (14)	5 (10)	9 (15)	
Perda de seguimento	4 (6)	3 (6)	4 (7)	

N, número de indivíduos; %, porcentagem de indivíduos, IQR: intervalo interquartil

3.2. Estudo *ex-vivo* e *in silico*

3.2.1. Análises de transcriptoma tumoral

Coorte FMRP/USP-Boldrini

Foi avaliado o perfil de expressão de genes da via Hippo-YAP1 obtidos da análise dos dados de transcriptoma de 50 TACs primários pediátricos provenientes da coorte FMRP/USP-Boldrini. Resumidamente, o RNA dos tumores foi extraído com o kit QIAmp RNeasy Mini kit (Qiagen, RE, Alemanha), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. As amostras foram quantificadas em fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos) e sua a qualidade foi avaliada com o uso do TapeStation 4200 (Agilent Technologies, CA, Estados Unidos). A integridade do RNA (*RNA Integrity Number*, RIN) com valores iguais ou maiores que oito foi considerada adequada.

O sequenciamento e a pré-análise dos dados foram realizados na University of Southern California Keck Genomics Platform (USC-KCP, Los Angeles, CA, EUA). Resumidamente, o RNA total foi submetido à depleção do RNA ribossomal (RNAr) por meio do NEBNext® rRNA Depletion Kit (E6310, New England Biolabs) e fragmentado em tamanho-alvo igual à 180 pb por fragmentação de calor. O preparo das bibliotecas de RNA, a conversão em cDNA e seleção de polyA foram feitos utilizando-se o NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (E7765, New England Biolabs), de acordo com as instruções do fabricante. Cada biblioteca foi normalizada e agrupada no mesmo dia do sequenciamento. O sequenciamento das 101 pb das extremidades pareadas (paired-end) foi realizado no NovaSeg 6000 System, utilizando-se NovaSeq S4 200 cycles flow cell (Illumina, San Diego, CA). As sequências foram convertidas em arquivos FASTQ por meio do BCL2FASTQ v1.8.4. Os arquivos FASTQ foram alinhados à referência GRCh37(hs37d5) com pacote STAR (v. 2.5.3a). O pacote Picard Mark Duplicates (v. 1.128) foi utilizado para identificar duplicatas nos arquivos BAM alinhados, gerando os arquivos BAM e arquivos métricos. O pacote Star-Fusion (v. 0.8.0) foi utilizado para identificar fusão de transcritos potenciais, assim como o STAR. O pacote Fusioncatcher (v. 0.99.7b) identificou a fusão de genes, quimeras e translocações já conhecidas, assim como novas. O pacote Salmon (v. 0.7.2) foi utilizado para quantificar os transcritos, gerando arquivos de quantificação, de informações e arquivos auxiliares. Neste fluxo de análise foi utilizado o HTSeq (v. 0.6.0) para o processamento e análise dos dados alinhados do RNA. O pacote Leafcutter (v. 1.0) foi utilizado para a quantificação de *splices* alternativos com mapeamento de splicing/splicing QTL diferencial. O GATK's RNA HaplotypeCaller foi utilizado para identificar SNPs e indels, e foi seguido pelo uso dos pacotes Picard RNA Metrics e SamtoolsStats. O resultado da quantificação dos transcritos foi expresso em transcritos por milhão (TPM).

Dados Público Disponíveis - Coortes avaliadas

Foram avaliados os dados expressão gênica tumoral de duas outras coortes de pacientes pediátricos que foram obtidos pela técnica de microarranjo (*microarray*) e que são apresentados em intensidade de fluorescência (IF) e uma coorte de pacientes adultos cujos dados se encontram disponíveis publicamente:

Coorte pediátrica COG/GSE76019: coorte de pacientes tratados sob o protocolo do COG (n=34) cujos dados estão disponíveis pelo *Gene Expression Omnibus* (GEO): GSE76019.

Coorte pediátrica IPACTR/GSE75415: coorte de pacientes coletados pelo IPACTR, que incluem adrenais normais (n=7), ACAs (n=5) e CACs (n=18), cujos dados estão disponíveis pelo GEO: GSE75415 (WEST *et al.*, 2007). Esta coorte foi usada apenas para comparação da expressão gênica de *YAP1* entre tecidos de adrenal normal, ACA e CAC.

Coorte adulta TGCA-ACC: coorte de amostras de pacientes avaliada pelo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), que inclui 79 carcinomas adrenocorticais (CAC) cujos dados foram obtidos por meio de RNA-Seq e disponibilizados pelo portal do *Broad Institute Fire-Browse* (<u>http://firebrowse.org/</u>) e do *cBioPortal for Cancer Genomics Portal* (<u>https://www.cbioportal.org</u>). Os dados do Illuminahiseq_rnaseqv2-RSEM_genes_normalized (MD5) foram transformados em log2.

Os pacientes das três coortes foram dicotomizados em "Baixa expressão" ou "Alta expressão", segundo expressão do RNAm do *YAP1* para cada coorte, respetivamente. As dicotomizações foram feitas seguindo as curvas de sobrevida ROC e o índice de *youden* para calcular o ponto de corte ótimo em relação a expressão de *YAP1* em cada coorte (**APÊNDICE B**). No caso da coorte pediátrica da FMRP/USP-Boldrini foi realizado o método penalizado de *Firth* no modelo de regressão de Cox, pois a separação dos grupos foi quase completa e o grupo "Baixa expressão" apresentou zero eventos. Assim, foi realizada a curva de Kaplan-Meier para a sobrevida total e a curva de sobrevida livre da doença.

3.2.2. Análise de enriquecimento de vias - GSEA

Para analisar as vias biológicas associadas com expressão de *YAP1*, foi realizada a análise de enriquecimento de vias (GSEA - *gene set enrichment analysis*,) utilizando-se o Broad Institute software (http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp). Nesta análise foram incluídas as vias do *Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Hallmarks* e *Reactome*. As pontuações de enriquecimento (*Enrichment scores*, ES) foram calculadas com base no teste estatístico de Kolmogorov-Smirnov, testado para significância usando 1000 permutações e também normalizados (NES) considerando o tamanho de cada *gene set,* com valor >1. O ponto de corte dos valores *p* nominal e os valores *q* da taxa de falsas descobertas (*false discovery rate,* FDR) foram definidos como 0,05 (MOOTHA et al., 2003;

SUBRAMANIAN et al., 2005). O enriquecimento foi realizado usando a correlação de Pearson da expressão de *YAP1*.

3.2.3. Análise mutacional

Uma vez que apenas a coorte adulta TGCA-ACC contém os dados de exoma tumoral, a plataforma cBioPortal (<u>https://www.cbioportal.org/</u>) foi utilizada a fim permitir a análise de mutações em genes da via Hippo e seus reguladores. As frequências de mutações nos grupos "Alta expressão" e "Baixa expressão" dos CACs foram comparadas.

Adicionalmente, foi realizada uma análise multivariada para identificar as variáveis associadas à sobrevida nesta coorte, usando o pacote *Survival analysis* do R.

3.2.4. Análises de metilação tumoral

Coorte FMRP/USP-Boldrini

Para investigar o perfil de metilação tumoral do gene YAP1, foram avaliados os dados do metiloma de 59 TACs provenientes da coorte pediátrica FMRP/USP-Boldrini. Resumidamente, o DNA foi extraído de amostras tumorais microdissecadas e congeladas frescas, usando-se o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada com o Qubit dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific), e a integridade foi avaliada com o Tape Station 4200 System (Agilent). O número de integridade do DNA (DIN) \geq 6 foi considerado adequado. Os dados brutos da análise do perfil de metilação também foram gerados no Keck Genomics da University of Southern California (Los Angeles, CA, EUA), utilizando-se Infinium MethylationEPIC BeadChip Array (Illumina), de acordo com o protocolo padronizado pela Illumina. Os arquivos brutos das intensidades de hibridização foram fornecidos pela facility e submetidos a um pipeline de controle de qualidade padrão em nosso grupo. O pacote minfi R v.1.30.0 (ARYEE et al., 2014) foi utilizado para o pré-processamento dos dados e estimativa valor de metilação (M-valor). O *M*-valor foi calculado como a razão log₂ das intensidades de sonda metilada versus sonda nãometilada para um mesmo sítio CpG [log2(metilado/não metilado)]. Nesta análise, M-valores próximos a 0 indicam uma intensidade semelhante entre sondas metiladas e não-metiladas, Mvalores positivos significam que mais moléculas são metiladas do que não-metiladas e M-

valores negativos significam o oposto (DU *et al.*, 2010). A correção de viés foi realizada usando a função *preprocessQuantile* implementada na linguagem estatística R (TOULEIMAT; TOST, 2012). A filtragem de dados removeu sondas com um p-valor de detecção superior a 0,01, sondas localizadas em cromossomos sexuais, sondas contendo polimorfismos de nucleotídeo único em sítios CpG e sondas de reação cruzada (PIDSLEY et al., 2016). Os dados de metilação completos (.idat e *M*-valores) desta coorte se encontram publicamente disponíveis no *National Center for Biotechnology and Information (NCBI)* GEO sob o número de acesso **GSE179175**. Para este trabalho foi analisado o padrão de metilação das 17 sondas anotadas ao gene *YAP1* e a sua vizinhança imediata, de acordo com o arquivo de anotação fornecido pela Illumina. Informações de anotação adicionais foram recuperadas do genoma humano Ensembl versão GRCh38.p13. A análise de agrupamento hierárquico não-supervisionado (UHCA) foi realizada considerando distância euclidiana e o método de Ward em R (versão 3.6). Esta mesma análise foi usada na coorte pediátrica IPACTR/GSE131350.

Coorte IPACTR/GSE131350

A avaliação do perfil de metilação tumoral do gene *YAP1* descrita acima foi replicada na coorte de pacientes pediátricos seguidos pelo IPACTR (**IPACTR/GSE131350**). Assim como em nossa corte, os dados de metilação foram obtidos por meio de microarranjo, utilizando-se o Infinium MethylationEPIC BeadChip Array (Illumina) e se encontram disponibilizados pelo GEO: GSE131350 (CLAY *et al.*, 2019).

3.3. Estudos in vitro

3.3.1. Cultura de células

Foi utilizada a linhagem celular de carcinoma adrenocortical humano H295R (RRID:CVCL_0458) gentilmente fornecida pela Professora Claudimara Lotfi (Universidade de São Paulo) (FRANÇA et al., 2013). Também foi utilizada a linhagem celular Y1 RRID:CVCL_0585) obtida de um tumor adrenocortical de camundongo LAF1.Adicionalmente, foi utilizada a linhagem celular de adenocarcinoma endocervical humano HeLa (RRID:CVCL_0030), gentilmente fornecida pelo Dr. Paulo Peitl Jr, PhD e o Dr. Beatriz Paixao, PhD (DNAapta®).

A linhagem celular H295R foi cultivada em meio RPMI 1640 (GIBCO, Life Technologies, Foster City, CA) suplementado com 2% SBF (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% penicilina-estreptomicina (GIBCO Life Technologies) e 1% de insulinatransferrina-selênio (ITS+Premix, BD Biosciences). As linhagens celulares Y1 e HeLa foram cultivadas em meio DMEM (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina.

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em monocamadas e mantidas a condições padrão de 37°C com 5% CO₂. As linhagens celulares humanas H295R e HeLa foram autenticadas pelo perfil de STR (*short tandem repeats*) no Laboratório de Genética do Professor Agnal Simões da FMRP-USP. A negatividade das linhagens celulares para contaminação por micoplasma foi confirmada pela avaliação por PCR do DNA e meio de cultura da célula, como previamente descrito (LEAL et al., 2015).

3.3.2. Reagentes

3.3.2.1. Verteporfina (Inibição farmacológica do YAP1)

A inibição farmacológica do YAP1 nos estudos *in vitro* e *in vivo* foi realizada utilizando-se o composto Verteporfina (VP; SML0534, Sigma Aldrich). A VP foi ressuspendida em dimetilsulfóxido (DMSO, controle) em concentração-estoque de 2,78 mM e diluída nas concentrações experimentais descritas a seguir nos respectivos experimentos.

3.3.2.2. RNA interferente- siRNA (silenciamento gênico)

O silenciamento gênico nas células H295R foi realizado utilizando-se o si*YAP1* (M-012200-00-0005), si*CTNNB1* (L-003482-00-0005 5) ou o controle negativo de silenciamento (siNonTargeting; D-001810-10-20) (ON-TARGETplus siRNA, Dharmacon GE), juntamente ao reagente de transfecção DharmaFECT 1 (T-2001-03; Dharmacon GE).

3.3.2.3. Ensaios TaqMan (avaliação da expressão gênica)

A avaliação da expressão gênica foi realizada utilizando-se os seguintes ensaios TaqMan (Applied BiosystemsTM ThermoFisher Scientific): *YAP1* (Hs009022712_g1), *CTGF* (Hs01026927_g1), CYR61 (Hs00155479_m1), (Hs00173359_m1), TEAD1 TEAD2 (Hs00366217_m1) TEAD4 (Hs01125032 m1), CCND1 (Hs00765553 m1), LATS2 (Hs00324396 m1), (Hs00169491 m1), (Hs00178979 m1), STK3 STK4 MYC (Hs00153408_m1), DVL3 (Hs00610263_m1) e (Hs00170025_m1) e GUSB (4325799).

3.3.2.4. Anticorpos (avaliação da expressão proteica)

Os anticorpos usados neste estudo e seus respectivos números de identificação e fornecedores estão descritos a seguir:

Abacam: anti-YAP (RRID:AB_2219140), anti-pYAP1 (Ser127)(RRID:AB_1524578), anti-N-caderina (RRID:AB_10696943), anti-Ciclina D1 (RRID:AB_2750906) e anti-Mst1 (RRID:AB_881247).

BD Biosciences: anti-Beta-catenina (RRID:AB_397555).

Santa Cruz Biotechnology: anti-Vimentina (RRID:AB_10917747), anti-Snail, (RRID:AB_10709902), anti-Twist (RRID:AB_1130910), anti-Dvl3 (RRID:AB_627343), anti-GAPDH (RRID:AB627678), goat-anti-rabbit IgG-HRP (RRID:AB_631746) e anti-m-IgGk BP-HRP (RRID:AB_2687626).

Cell Signaling Tchnology: anti-fibrilarina (RRID:AB_2278087).

3.3.3. Silenciamento gênico

O silenciamento do gene *YAP1* ou do gene *CTNNB1* na linhagem celular H295R foi realizado utilizando RNA interferente (siRNA). Para isso, $3*10^4$, $3*10^5$ e $1*10^6$ células por poço foram semeadas em placas de 96, 24 e 6 poços, respectivamente, em meio de cultivo completo, mas livre de antibióticos. Após 24 horas as células foram transfectadas com 25 nM de siRNA específico para *YAP1*, *CTNNB1* ou controle negativo, conforme detalhado no item 3.2.2.2. Após outras 24 horas, o meio de cultivo foi substituído com meio completo.

3.3.4. Ensaio de viabilidade celular

A proliferação celular foi determinada por colorimetria usando o ensaio baseado em MTS, o CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Reagent (Promega). Brevemente, as células foram semeadas em uma densidade inicial de $3*10^4$ (H295R), $2*10^4$ (Y1) ou $1*10^4$ (HeLa) células por poço em placas de 96 poços e incubadas por 48 horas a 37 °C e 5% CO₂. Nos tratamentos farmacológicos, as culturas celulares foram tratadas com VP em concentrações entre 0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 20 µM e incubadas durante 48 horas. Após o tratamento, o sobrenadante de cada poço foi removido, os poços foram lavados com DPBS e, posteriormente, 20 µl da solução de MTS e 100 µl meio de cultivo livre de VP foram adicionados a cada poço e incubados por 1 hora a 37 °C, 5% CO₂. A intensidade de absorbância foi medida em um leitor de microplaca em 490 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e a proliferação celular foi expressa como percentagem relativa às células controle não-tratadas.

3.3.5. Ensaio de formação de colônias em ágar mole

As células H295R foram primeiramente transfectadas transitoriamente durante 72 horas ou tratadas com VP (10 μ M) por 48 horas em placas de 6 poços. Posteriormente foram ressuspensas e semeadas para o crescimento independente de ancoragem. Para que as células cresçam independente de ancoragem foram formadas duas capas com diferente concentração de agarose, a partir de agarose 4% (18300012; Gibco). Para isso, 1,5 ml do meio de cultivo contendo 0,7% de agarose foi adicionado em cada poço de placa de 6 poços, formando assim a capa inferior. Após a solidificação desta, outros 1,5 mL de meio de cultivo contendo 0,4% de agarose e 2*10⁴ células — tratadas conforme descrito acima — foram adicionadas na parte superior, seguidos por mais 1 ml de meio de cultivo. As placas foram incubadas por 2 semanas e o meio de cultivo foi trocado a cada 4 dias. As colônias foram visualizadas e as imagens foram obtidas usando um microscópio Zeiss. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e foram contados pelo menos 5 campos em cada replicata biológica.

3.3.6. Ensaio de invasão celular

O ensaio de invasão celular foi realizado usando câmeras de invasão BioCoat Matrigel (Corning, NY), de acordo com o protocolo do fabricante. As células H295R foram semeadas em triplicatas biológicas a 3*10⁵ células/inserto. As células foram transfectadas

transitoriamente por 24 horas ou tratadas com VP (10 uM) por 48 horas em placas de 6 poços. Cada câmera foi colocada dentro de um poço em placas de 24 poços. As células foram suspendidas em 500 µl de meio RPMI livre de soro e colocadas dentro do compartimento superior das câmeras. Em cada poço foram adicionados 700 µl de meio RPMI suplementado com 5% de SR3, utilizado como um quimioatraente. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas para permitir a invasão celular. Os insertos foram fixados e corados com cristal violeta. As imagens a partir dos insertos corados foram tomadas usando um microscópio de luz (Zeiss).

3.3.7. Ensaio de ciclo celular

As células H295R foram cultivadas e transfectadas por 72 horas. Posteriormente, para a avaliação do ciclo celular, foram usadas $1*10^6$ células, lavadas em DPBS e fixadas em etanol 70% gelado e mantidas a 4°C até a marcação. As células foram tratadas com 400 µl de tampão de marcação (1 ml de iodeto de propídio 50 µg/ml, 50 µl de RNase A 10 mg/ml, 5 µl de Triton X-100 e 3,95 ml de PBS 1x). As populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular foram quantificadas por meio do citômetro de fluxo FACS Canto, utilizando-se o software FlowJo X.

3.3.8. Imunofluorescência

As células H295R foram semeadas e tratadas com VP 10 µM sobre lamínula em placas de 24 poços por 48 horas. Depois do tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, fixadas com 4% de paraformaldeído e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA) 2%. As células foram incubadas com os anticorpos primários *overnight* em câmara úmida a 4°C. Os anticorpos secundários foram incubados por 2 horas em uma câmara úmida à temperatura ambiente em ausência de luz. Os núcleos celulares foram corados com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). A imunofluorescência foi visualizada com um microscópio confocal Zeiss Observer.z1 e avaliados usando o Icy software (GLPv3).

3.3.9. Extração de RNA e PCR quantitativa em tempo real

O RNA total foi isolado usando o reagente TRIzol (Invitrogen) de acordo ao protocolo do fabricante. O RNA foi quantificado medindo a absorbância a 260 nm (NanoDrop, ThermoScientific) e sua integridade aferida de acordo com a razão 260/280 nm. A reação de

transcrição reversa foi realizada usando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (AppliedBiosystems) e a enzima MultiScribe, seguindo o protocolo do fabricante.

A PCR quantitativa em tempo real foi realizada utilizando-se o *ABI7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, CA, USA). Foram usados ensaios TaqMan[®] específicos, conforme indicados no item 3.2.2.3. O gene beta-glucuronidase (*GUSB*) foi usado como gene controle interno. Os resultados foram quantificados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct: *cycle threshold*) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.3.10. Extração de proteínas e Western blotting

Para os ensaios de avaliação de expressão proteica, 1*10⁶ células foram semeadas e tratadas com VP por 48 horas ou transfectadas com siRNA por 72 h. Para a extração da proteína total as células foram lavadas com DPBS, lisadas com auxílio do tampão CelLyticTM M Reagent (Sigma Aldrich) contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (P8340 e P5726, respectivamente, Sigma Aldrich) por 15 minutos em temperatura ambiente em agitação e posteriormente centrifugadas por 20 minutos a velocidade máxima. O sobrenadante foi transferido a um tubo novo e armazenado a -80°C.

Para a extração das frações nuclear e citoplasmática foi usado o tampão CelLytic NuCLEAR Extraction Kit (Sigma Aldrich) e foram seguidas as indicações do fabricante. Brevemente, as células tratadas foram lavadas duas vezes com DPBS 1x, transferidas para um tubo de 1,5 mL e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e segundo o volume do pacote celular foi estimado o volume do Tampão de lise (Tampão de lise hipotônico 1x, DTT 0,1M, coquetel de inibidores de proteases e de fosfatases). As células foram incubadas no tampão de lise por 15 minutos em gelo. Posteriormente, foi adicionada a solução IGEPAL CA-630 10%, os tubos foram imediatamente agitados em vórtex vigorosamente por 10 segundos e centrifugadas por 30 segundos a velocidade máxima a 4°C. O sobrenadante, que representa a fração citoplasmática, foi transferido para outro tubo e armazenado a -80°C. O *pellet* resultante foi ressuspenso na solução tampão de extração (Tampão de extração, DTT 0,1M, coquetel de inibidores de proteases e fosfatases). Os tubos foram deixados em agitação por 30 minutos a 4°C, centrifugados a velocidade máxima por 5

minutos a 4°C e o sobrenadante, que representa a fração nuclear, foi transferido a um tubo novo e armazenado a -80°C.

Após os procedimentos de extração proteica supracitados, quantidades iguais (20 µg) de proteína por tratamento foram separadas por SDS-PAGE, e eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose. Para a imunodetecção, as membranas foram bloqueadas por 1 hora em temperatura ambiente em 5% de *Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk* (1706404XTU, Bio Rad) em TBS-T (Tris 1M; NaCl 5M e Tween 20) e incubadas *overnight* com os anticorpos primários. A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usada como controle de aplicação da proteína total e da fração citoplasmática. A fibrilarina foi usada como controle de aplicação da fração nuclear.

A detecção das bandas de interesse foi realizada incubando-se as membranas com anticorpos secundários conjugados à peroxidade (HRP), em temperatura ambiente por 1 hora e detectados por quimioluminescência (Immun-Star[™] WesternC[™] Chemiluminescence Kit) utilizando-se o sistema ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad[™], Hercules, CA, USA). As bandas adquiridas foram analisadas usando o Acquired Image Lab[™] software (Bio-Rad).

3.4. Estudo in vivo

3.4.1. Desenvolvimento do modelo xenográfico de carcinoma adrenocortical

Este seguimento do estudo foi desenvolvido no Laboratório de Experimentação Animal do Hemocentro da FMRP-USP e obedeceu às diretrizes do *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE). O estudo *in vivo* foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP (CEUA-FMRP-USP) e seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Aprovação #196/2017, **ANEXO A**). Adicionalmente, devido ao uso de animais transgênicos, o presente trabalho foi aprovado pela Comissão interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio) e pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) (Aprovação #297/2017.016.01, **ANEXO B**).

Os efeitos da inibição farmacológica do YAP1 foram investigados utilizando-se camundongos da linhagem NOD/SCID-gamma (NSG, NOD.*Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl*/SzJ,

IMSR Cat# JAX_005557, RRID:IMSR_JAX:005557). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (entre 22°C e 25°C), em ciclo de claro-escuro de 12 horas, com acesso *ad libitum* à água e ração padrão irradiada (Nuvilab CR-1; Nuvital[®] Nutrientes LTDA, Curitiba, PR).

Foram utilizados 12 fêmeas e 8 machos com idade entre 8 e 12 semanas de vida. Para o desenvolvimento dos xenoenxertos, células H295R (1*10⁶) foram ressuspensas em 100 µl de solução PBS:Matrigel (1:1; Matrigel® Matrix Basement Membrane HC, 354262; Corning) e inoculadas em cada flanco dos camundongos por via subcutânea. O peso dos animais e o tamanho dos tumores foram aferidos semanalmente durante toda a duração do estudo. O volume dos tumores foi aferido com auxílio de um cáliper (Starrett), sendo aferidos os diâmetros perpendiculares maior (D) e menor (d) e volume calculado por meio da fórmula: V (mm³) = (D x d²)/2.

3.4.2. Ensaio de inibição do crescimento tumoral

Foi realizado o estudo do potencial de inibição do crescimento tumoral pela inibição do YAP1 por meio do tratamento farmacológico com VP. O tratamento foi iniciado após a sétima semana de inoculação das células, quando os tumores atingiram um volume médio igual a 100 mm³. Os camundongos foram submetidos ao tratamento com VP (100 mg/kg de peso corporal, n=10) ou DMSO (controle, n=10), por meio de injeções intraperitoneais, três vezes por semana, em um total de 12 doses de tratamento em um período de 4 semanas.

Ao final das 11 semanas de observação, os animais foram anestesiados com 1 ml de tribromoetanol (TBE) (20 mg/ml) administrado por via intraperitoneal e sacrificados por meio de deslocamento cervical, após verificação de ausência. Foi realizada punção cardíaca para coleta de sangue. Após a coleta, o sangue foi centrifugado para isolamento do soro, que foi alíquotado e congelado a –20°C para avaliação das concentrações de cortisol por meio de radioimunoensaio - RIA (MOREIRA; ELIAS, 1992). Os xenoenxertos foram extirpados, pesados e fotografados. Uma porção de cada amostra foi armazenada em formalina a 4% para subsequente análise histológica e da proliferação tumoral.

3.4.3. Análise histológica

As análises histológicas e de proliferação celular foram realizadas pelo Professor Fernando Silva Ramalho no Departamento de Patologia da FMRP-USP.

Os xenoenxertos extirpados dos camundongos foram fixados em formalina 4% por 24 horas. Após, foram embebidos em parafina e se obtiveram seções de 5 µm. As seções foram coradas com hematoxilina e eosina. A avaliação da coloração e a aquisição das imagens foram realizadas utilizando um microscópio óptico Zeiss (AxioCam MRC) e um software de aquisição de imagens (Zeiss AG).

Foi avaliado o índice de Wieneke adaptado, onde se analisaram 4 itens: taxa de mitoses, presença de mitoses atípicas, presença de necrose e invasão sinusoidal.

3.4.4. Proliferação tumoral

Foi realizada a análise da proliferação tumoral por meio da imunorreatividade nuclear para marcador Ki67 nas amostras dos xenoenxertos fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE). Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-Ki67, diluído a 1:100. A detecção de sinal foi realizada por meio do ensaio REVEAL Biotin-Free Polyvalent Kit HRP (REVEAL®, Amsbio, Mainz, Alemanha). Os complexos antígeno/anticorpo foram marcados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories Inc.) e contrastados com hematoxilina de Harris. A avaliação da coloração e a aquisição das imagens foram realizadas utilizando um microscópio óptico Zeiss (AxioCam MRC) e um software de aquisição de imagens (Zeiss AG). A imunorreatividade nuclear do Ki67 em amostras dos xenoenxertos de camundongos foi avaliada por meio do software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). A imunorreatividade nuclear do Ki67 foi considerada positiva em amostras com núcleo marcado.

3.5. Análise estatística

As comparações entre as médias das variáveis contínuas entre os grupos foram analisadas por meio do teste t ou análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey (paramétricas) e entre as medianas por meio dos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis (não-paramétricas), conforme indicado nas legendas das figuras e tabelas. As comparações

entre as variáveis categóricas entre os grupos foram analisadas utilizando-se os testes exato de Fisher ou qui-quadrado, conforme indicado nas figuras e tabelas. Um valor p < 0,05 foi considerado significante. Os dados foram representados conforme indicado nas figuras e tabelas.

A sobrevida livre de evento foi definida como o tempo a partir da inscrição no protocolo COG até a data da progressão da doença, morte ou outros eventos recentes. Em todas as coortes avaliadas foi analisada a sobrevida geral, onde a morte foi considerada o evento desfavorável. A sobrevida livre da doença nas coortes FMRP/USP-Boldrini e TCGA foi definida como tempo após o término do tratamento primário (ressecção do tumor) em que o paciente permanece livre do tumor. As análises de sobrevida foram realizadas utilizando-se curvas de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste *log-rank*, por meio do pacote *Survival* em R.

As análises estatísticas, estimação da variação e *plots* foram realizadas usando os programas de análise estatística GraphPad Prism 9.0 (GraphPad) ou R (v3.6.0). Os asteriscos apresentados nos gráficos representam a magnitude da significância estatística (*p< 0,05; **p< 0,01 e ***p< 0,005) e n.s. representa diferenças não-significativas.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Análise dos estudos *ex-vivo e in silico*

Com a finalidade de investigar se o oncogene *YAP1* está associado com a progressão dos TACs, avaliamos sua expressão na coorte pediátrica da FMRP/USP-Boldrini e a partir dos dados públicos das duas coortes pediátricas (COG/GSE76019 e IPACTR/GSE75415) e da coorte de pacientes adultos avaliados pelo TCGA.

4.1.1. Características clínicas e sobrevida dos pacientes pediátricos de acordo com a expressão do oncogene *YAP1*

O subgrupo de pacientes provenientes da coorte pediátrica da FMRP/USP-Boldrini cujo transcriptoma tumoral foi avaliado compreendeu 34 meninas (68%) e 16 meninos. A mediana de idade ao diagnóstico foi 1,6 anos, sendo que apenas 7 (14%) crianças foram diagnosticadas com mais de 4 anos de idade. A apresentação clínica predominante foi a virilização (n=40, 80%), seguida por apresentação assintomática (n=7; 14%), síndrome de Cushing (n=2; 4%), e virilização com síndrome de Cushing (n=1; 2%). Doze (24%) pacientes apresentaram doença avançada ao diagnóstico: não-localizada (estádio III: 18%) ou metastática (estádio IV: 6%). Vinte e dois tumores foram classificados como AAC (44%), 12 como de potencial de malignidade incerto (24%), 12 como CAA (24%) e 4 não foram diagnosticados (8%). Cinco pacientes (10%) apresentaram recidiva ou metastáse após a ressecção do tumor primário. A mediana de seguimento dos pacientes foi igual a 60,6 meses anos e até o momento 5 pacientes (10%) foram à óbito em decorrência da doença. Tanto a sobrevida livre de doença quanto a sobrevida total em 5 anos foram iguais a 90%.

Nesta coorte pediátrica, os pacientes foram dicotomizados nos grupos "Alta expressão" (n=22, mediana: 53 TPM) e "Baixa expressão" (n=28 mediana: 25,5 TPM) de *YAP1* (**Figura 5**). O valor de corte para a dicotomização foi igual a 37 TPM (APÊNDICE B).

Conforme descrito na **Tabela 5**, não observamos associação entre as características clínicas e prognósticas dos pacientes pediátricos e a expressão do RNAm de *YAP1*. Contudo, observamos óbitos apenas no grupo de pacientes com alta expressão de *YAP1* e os mesmos foram seguidos por menos tempo. Da mesma forma, observamos que tanto a sobrevida total

quanto a sobrevida livre da doença foram significativamente menores nos pacientes com alta expressão do *YAP1* (Figuras 5A e B).

Característica	Total	Baixa expressão de <i>YAP1</i>	Alta expressão de <i>YAP1</i>	<i>p</i> -valor
Pacientes, n (%)	50 (100)	28 (56)	22 (44)	-
Procedência, n (%)				0,561
FMRP-USP	23 (46)	11 (39)	12 (55)	
Centro Infantil Boldrini	27 (54)	17 (61)	10 (45)	
Sexo, n (%)				0,126
Feminino	34 (68)	22 (79)	12 (55)	
Masculino	16 (32)	6 (21)	10 (45)	
Idade ao diagnóstico (anos)				
Mediana	1,6	1,5	2	0,278
IQR	1,2 – 2,9	1,1 - 2,8	1,3 - 4	
< 4 anos	43 (86)	26 (93)	17 (77)	0,217
>4 anos	7 (14)	2 (7)	5 (23)	
Apresentação clínica, n (%)				0,33
Assintomática	7 (14)	2 (7)	5 (23)	
Sd. de Cushing	2 (4)	1 (4)	1 (4)	
Virilização	40 (80)	24 (86)	16 (73)	
Virilização e Sd. de Cushing	1 (2)	1 (4)	0	
Estádio tumoral, n (%)				0,911
Ι	27 (54)	16 (57)	11 (50)	
II	11 (22)	6 (21)	5 (23)	
III	9 (18)	5 (18)	4 (18)	
IV	3 (6)	1 (4)	2 (9)	
Diagnóstico histopatológico, n	(%)			0,637
Adenoma	22 (44)	13 (46)	9 (41)	
Malignidade incerta	12 (24)	7 (25)	5 (23)	
Carcinoma	12 (24)	5 (18)	7 (32)	

Tabela 5. Características prognósticas dos pacientes pediátricos com TAC provenientesda coorte FMRP/USP-Boldrini de acordo com a expressão do gene YAP1

Não avaliados	4 (8)	3 (11)	1 (4)	
Recidiva pós-cirúrgica, n (%)				0,155
Não	45 (90)	27 (96)	18 (82)	
Sim	5 (10)	1 (4)	4 (18)	
Mutação germinativa p53 p.R.	337H			0,495
Sim	43 (86)	23 (82)	20 (91)	
Não	2 (4)	2 (7)	0	
Não avaliados	5 (10)	3 (11)	2 (9)	
Mutação somática CTNNB1 (é	exon 3), n (%)			0,99
Sim	2 (4)	1 (4)	1 (5)	
Não	39 (78)	20 (71)	19 (85)	
Não avaliados	9 (18)	7 (25)	2 (10)	
Seguimento (meses)				0,004
Mediana	60,6	81	39,6	
IQR	21,3 - 108	44,4 - 115,2	15,9 – 59,7	
Desfecho, n (%)				0,04
Doença em remissão	40 (80)	24 (86)	16 (73)	
Doença ativa	2 (4)	1 (4)	1 (5)	
Óbito	5 (10)	0	5 (23)	
Perda de seguimento	3 (6)	3 (11)	0	

N, número de indivíduos; %, porcentagem de indivíduos, IQR: intervalo interquartil

Pacientes cujas características não foram avaliadas ou que tiveram perda de seguimento não foram incluídos nas análises. As diferenças entre as variáveis contínuas e categóricas entre os grupos de expressão de *YAP1* foram analisadas utilizando-se os testes Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis e exato de Fisher ou qui-quadrado, respectivamente.



Figura 5. Sobrevida de pacientes pediátricos com TAC provenientes da coorte FMRP/USP-Boldrini.

Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier considerando a expressão de *YAP1* e sobrevida total (**A**) e sobrevida livre da doença (**B**).

Na coorte pediátrica COG/GSE76019, os pacientes também foram dicotomizados em dois grupos de acordo com a expressão de *YAP1*: "Alta expressão" (n=15, mediana: 7,52 IF) e "Baixa expressão" (n=19 mediana: 6,57 IF). O valor de corte para a dicotomização foi igual a 7,005 de IF (**APÊNDICE B**). A **figura 6A** mostra que a alta expressão de *YAP1* também foi associada com menor sobrevida livre de doença nestes pacientes pediátricos (HR= 7,8; p= 0,0018). Ainda, reforçando resultados anteriores de nossa coorte (ABDUCH *et al.*, 2016), as análises realizadas a partir da coorte pediátrica IPACTR/GSE75415 não demonstraram diferenças entre as médias de expressão de *YAP1* em amostras de adrenal normal e amostras de TACs pediátricos (**Figura 6B**).



Figura 6. Expressão gênica de *YAP1* e sobrevida livre da doença de pacientes pediátricos com TAC.

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier considerando a expressão de *YAP1* e a sobrevida livre do evento em pacientes pediátricos com tumores adrenocorticais seguidos pelo *Children's Oncology Group* (COG). Dados públicos de microarranjos disponíveis na base de dados GEO (Número de acesso GSE76019). (**B**) Expressão gênica do *YAP1* em adrenais normais (n=7), adenomas adrenocorticais (AAC, n=5) e carcinomas adrenocorticais (CAC, n=18) de pacientes pediátricos provenientes do *International Pediatric Adrenocortical Tumors Registry* (IPACTR), obtida a partir de dados públicos de microarranjo disponíveis na base de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO, número de acesso GSE75415).

4.1.2. Características clínicas e sobrevida dos pacientes adultos de acordo com a expressão do oncogene YAP1

A tabela 6 apresenta as características clínicas dos pacientes adultos com CAC cujos dados do RNA-Seq estavam disponíveis na base de dados do TCGA. Este subgrupo de pacientes compreendeu 48 mulheres (61%) e 31 homens. A mediana de idade ao diagnóstico foi 45 anos. Vinte e cinco (32%) pacientes apresentaram doença avançada ao diagnóstico: não-localizada (estádio III: 10%) ou metastática (estádio IV: 22%). Em relação ao estado funcional dos tumores, a maioria era funcionante (n=48, 60,8%). Houve predominância de hipersecreção de cortisol (20,3%), cortisol e androgênios (20,3%) e androgênios (10,1%). Dezoito pacientes (22,8%) apresentaram recidiva ou metástase após a ressecção do tumor primário. A mediana de seguimento dos pacientes foi igual a 39,2 meses e 28 pacientes (35,4%) foram à óbito em decorrência da doença.

Os pacientes adultos com CACs provenientes do TCGA-ACC também foram dicotomizados em "Baixa expressão" (n=60, mediana: 896 TPM) e "Alta expressão" (n=19 mediana: 1878 TPM) de *YAP1*, e o valor de corte para a dicotomização foi igual a 1481,8 TPM (**APÊNDICE B**). A partir desta divisão, observamos que a alta expressão de *YAP1* foi associada com prognóstico desfavorável dos pacientes (sobrevida total: HR= 4,5; p< 0,0001 e sobrevida livre da doença: HR= 4,01; p= 0,00021; **Figuras 7A** e **7B**, respectivamente).

Conforme descrito na **Tabela 6**, observamos associação apenas entre o estádio tumoral dos pacientes adultos e a expressão do RNAm de *YAP1*. Adicionalmente, observamos maior número de óbitos no grupo de pacientes com alta expressão de *YAP1* (n=12; 63,2%) e os mesmos foram seguidos por menos tempo.

Característica	Total	Baixa expressão de	Alta expressão de	<i>p</i> -valor	
		YAP1	YAP1	-	
Pacientes, n (%)	79 (100)	60 (76)	19 (24)	-	
Sexo, n (%)					
Feminino	48 (61)	34 (57)	14 (74)	0,281	
Masculino	31 (39)	26 (43)	5 (26)		
Idade ao diagnóstico (anos)					
Mediana (IQR)	49 (35 - 59,5)	49,5 (35,3 - 59,2)	45 (33 - 60)	0,922	
Estudo funcional do tumor, n	(%)			0,177	
Funcionante					
Cortisol	16 (20)	12 (20)	4 (21)		
Androgênio e cortisol	16 (20)	9 (15)	7 (37)		
Androgênio	8 (10)	6 (10)	2 (10,5)		
Mineralocorticoide	3 (4)	3 (5)	0		
Mineralocorticoide e	1 (2)	0	1 (5)		
cortisol					
Estrógenos	2 (2,5)	2 (3)	0		
Estrógenos e	2 (2,5)	2 (3)	0		
androgênios					
Não-funcionante	26 (33)	23 (38)	3 (16)		

 Tabela 6. Características prognósticas dos pacientes adultos com CAC de acordo com a

 expressão do RNAm do gene YAP1 a partir da base de dados do TCGA

Não disponível	5 (6)	3 (5)	2 (10,5)	
Estádio tumoral (T), n (%)				0,047
T1	9 (11)	8 (13)	1 (5)	
T2	42 (53)	35 (58)	7 (38)	
T3	8 (10)	3 (5)	5 (27)	
T4	17 (22)	13 (22)	4 (20)	
Não disponível	3 (4)	1 (2)	2 (10)	
Estádio nodal (N), n (%)				0,675
NO	67 (84)	51 (85)	16 (85)	
N1	9 (12)	8 (13)	1 (5)	
Não disponível	3 (4)	1 (2)	2 (10)	
Estádio TNM, n (%)				0,497
Ι	9 (11)	8 (13)	1 (5)	
II	37 (46)	30 (50)	7 (37)	
III	16 (20)	11 (18)	5 (26)	
IV	15 (19)	10 (17)	5 (26)	
Não disponível	3 (4)	1 (2)	1 (5)	
Recidiva pós-cirúrgica, n (%	b)			0,169
Não	54 (68,3)	44 (73,3)	10 (52,6)	
Sim	18 (22,8)	11 (18,4)	7 (36,8)	
Não disponível	7 (8,9)	5 (8,3)	2 (10,6)	
Mutação somática CTNNB1	(éxon 3), n (%)			0,071
Sim	13 (16)	7 (12)	6 (32)	
Não	66 (84)	53 (88)	13 (68)	
Seguimento (meses)				0,001
Mediana	39,25	43,87	19,04	
IQR	22,70-67,05	29,52 - 73,45	16,24 - 40,88	
Desfecho, n (%)				0,006
Vivo	51 (65)	44 (73)	7 (37)	
Óbito	28 (35)	16 (27)	12 (63)	

N, número de indivíduos; %, porcentagem de indivíduos, IQR: intervalo interquartil

Pacientes cujas características não foram avaliadas ou que tiveram perda de seguimento não foram incluídos nas análises. As diferenças entre as variáveis contínuas e categóricas entre os grupos foram analisadas utilizando-se os testes Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis e exato de Fisher ou qui-quadrado, respectivamente.

Figura 7. Curvas de sobrevida de pacientes adultos com CAC de acordo com a expressão do RNAm do gene *YAP1* a partir da base de dados.



(A) Curva de sobrevida total e (B) sobrevida livre da doença de pacientes adultos com carcinoma adrenocortical (CAC) de acordo com os dados de expressão de RNAm do gene YAP1 a partir da base de dados do TCGA.

As análises uni- e multivariada usando as variáveis clínicas previamente avaliadas nesta coorte (ZHENG, *et al.*, 2016) confirmaram que a expressão de *YAP1* é um marcador de prognóstico independente de sobrevida total para pacientes adultos com CAC (**Tabela 7**).
Variável	Análise univariada			Análise multivariada		
	HR	IC 95%	<i>p</i> -valor	HR	IC 95%	<i>p</i> -valor
Expressão	4,5	2,03 - 9,97	0,0001	4,0	1,65 – 9,79	0,002
de YAP1						
(Alta)						
Idade (>50	1,8	0,85 - 3,83	0,127	2,5	1,03 – 5,88	0,041
anos)						
Sexo	1,0	0,47 - 2,14	0,999	0,6	0,22 - 1,58	0,299
(feminino)						
Estágio			·		·	·
tumoral						
II	2,4	0,29 - 19,32	0,419	2,0	0,24 - 17,51	0,519
III	8,6	1,04 - 71,93	0,046	5,9	0,65 - 53,50	0,116
IV	21,3	2,62 -	0,004	17,3	1,91 –	0,011
		173,13			156,59	
Secreção						
autônoma	2,2	1,03 - 4,78	0,042	2,4	0,89 - 6,44	0,081
de cortisol						

Tabela 7. Análise multivariada considerando dados clínicos e a expressão do YAP1 dospacientes adultos com CAC a partir dos dados disponíveis no TCGA

HR: *hazard ratio*, IC 95%: intervalo de confiança 95%. Expressão do oncogene *YAP1* ("Alta expressão" *vs* "Baixa expressão"), idade em anos (maior a 50 anos), estadiamento tumoral (ENSAT), sexo (feminino) e produção de cortisol positiva. A análise multivariada foi realizada por meio da regressão de Cox para identificar os fatores de prognóstico preditivos para a sobrevida total dos pacientes adultos com carcinoma adrenocortical (CAC) a partir dos dados disponíveis no TCGA.

4.1.3. Análises de enriquecimento de vias

As análises de enriquecimento de vias demonstraram que várias vias envolvidas na progressão da tumorigênese são enriquecidas nos grupos de tumores com alta expressão do *YAP1* nas três coortes cujos transcriptomas foram avaliados (**Figura 8**).

Entre estas vias observamos o complexo de transativação de beta-catenina com o fator de transcrição TCF, o qual foi enriquecido positivamente nas três casuísticas avaliadas: NES=1,81 na coorte FMRP/USP-Boldrini; NES=1,94 na coorte COG/GSE76019 e NES=1,96 na coorte de adultos do TCGA. Da mesma forma, a via de hipóxia também foi positivamente enriquecida nas três coortes: NES=1,77 na FMRP/USP-Boldrini, NES=2,11 na

COG/GSE76019 e NES=2,09 na coorte de adultos do TCGA. Vias relacionadas à proliferação celular, como ponto de verificação da fase G2/M do ciclo celular, alvos do fator de transcrição E2F e *spindle* mitótico também se encontraram positivamente enriquecidas nos pacientes pediátricos e nos adultos.

Ressaltamos que algumas vias relacionadas à invasão tumoral, como transição epitéliomesênquima (EMT), degradação da matriz extracelular, degradação do colágeno, interações da matriz extracelular, regulação negativa da adesão celular, entre outras, também se encontram positivamente enriquecidas nos grupos de tumores com alta expressão do *YAP1* nas 3 coortes avaliadas.



Figura 8. Análise de GSEA das três coortes de TAC segundo a expressão do YAP1.

Resultados representativos da análise de enriquecimento de vias nas três coortes avaliadas. Os *dot-plots* foram construídos considerando as vias com maiores *gene ratios* de acordo com a ordem no *gene-ratio*. Contagem (*count*): representa o número de genes na lista de uma mesma via. Na legenda, a cor vermelha mais escura está relacionada com menor valor *q* do FDR.

4.1.4. Análise mutacional nos CAC de pacientes adultos

Para investigar a associação entre mutações nos componentes da via HIPPO e seus reguladores com a expressão do mRNA de YAP1 em CAC, comparamos a frequência de

mutações somáticas nos grupos de pacientes adultos provenientes do TCGA-ACC. Foi observada maior frequência de mutações no gene *PAK3* no grupo de alta expressão do *YAP1* comparado com o de baixa expressão do *YAP1* (**Figura 9**). Não houve diferenças significativas na frequência de mutações nos outros genes avaliados. Contudo, como pode se observar na **Figura 9**, existe uma tendência de maior frequência de mutações no *CTNNB1* e no *FAT3* no grupo de alta expressão do *YAP1* comparado com o de baixa expressão.



Figura 9. Frequência de mutações em genes relacionados com a via HIPPO.

Genes	Alta expressão (n=19)		Baixa expressão (n=60)		Total (n=79)		<i>p</i> -valor
	n	%	n	%	n	%	
CTNNB1	6	31,58	7	11,67	13	43,25	0,071
FAT1	1	5,26	2	3,33	3	8,60	0,567
FAT3	2	10,53	0	0	2	10,53	0,056
FAT4	3	15,79	3	5,0	6	20,79	0,147
ТАОК1	1	5,26	0	0	1	5,26	0,241
MAPK1	1	5,26	0	0	1	5,26	0,241
РАКЗ	3	15,79	0	0	3	15,79	0,017
<i>TP53</i>	5	26,32	11	18,33	16	44,65	0,516

Frequência de mutações (n) observadas em genes relacionados com a via HIPPO e nos genes *CTNNB1* e *TP53*, nos grupos "Alta expressão" e "Baixa expressão" do YAP1 usando os dados de pacientes adultos a partir do TCGA-ACC. Imagem obtida usando o portal *cBioPortal for Cancer Genomics*.

4.1.5. Análise do perfil de metilação tumoral do gene YAP1

O subgrupo de pacientes provenientes da coorte pediátrica da FMRP/USP-Boldrini no qual avaliamos o perfil de metilação tumoral compreendeu 42 meninas (71%) e 17 meninos. A mediana de idade ao diagnóstico foi 2 anos, sendo que 14 (24%) crianças foram diagnosticadas com mais de 4 anos de idade. A apresentação clínica predominante foi a virilização (n=45, 76%), seguida por apresentação assintomática (n=7; 12%), síndrome de Cushing (n=6; 10%), e virilização com síndrome de Cushing (n=1; 2%). Onze (18%) pacientes apresentaram doença avançada ao diagnóstico: não-localizada (estádio III: 8%) ou metastática (estádio IV: 10%). Vinte e cinco TACs foram diagnosticados como AAC (42%), 14 como de potencial de malignidade incerto (24%), 16 como CAA (27%) e 4 não foram diagnosticados (7%). A mediana de seguimento dos pacientes foi igual a 52,8 meses e até o momento 9 pacientes foram à óbito em decorrência da doença. A sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 78% e a sobrevida total em 5 anos foi igual a 82%.

A análise de agrupamento não-supervisionada (UHCA) considerando os dados de metilação do gene *YAP1* resultou na identificação de dois *clusters* (**Figura 10A**), que foram designados como "grupo 1" (n=23) e "grupo 2" (n=36). Não observamos diferença significativa entre as medianas de metilação entre os grupos (p=0,634, **Figura 10B**). contudo, 59% (10 /17) das sondas se encontraram diferencialmente metiladas entre estes dois grupos (**Tabela 8**). Destacamos ainda que dentre as 10 sondas diferencialmente metiladas, apenas 1 é anotada à região regulatória transcricional do gene *YAP1* (cg20988436), enquanto as demais são anotadas ao corpo do gene. Não observamos diferença significativa nos níveis de mRNA de *YAP1* entre os grupos de metilação (**Figura 10C**).



Figura 10. Perfil de metilação e respectiva expressão do gene *YAP1* em TACs de pacientes pediátricos provenientes da coorte FMRP-USP-Boldrini.

(A) Dendograma resultante da análise de agrupamento não-supervisionada de 59 tumores adrenocorticais (TACs) pediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini considerando os dados de metilação de 17 sondas anotadas no gene *YAP1* pertencentes ao *EPIC Methylation Array* (Illumina) demonstrando 2 grupos de TAC e respectivo *heatmap* demonstrando os níveis individuais de metilação por sonda e por TAC. (B) Valores médios individuais de metilação das 17 sondas e medianas do gene *YAP1* de acordo com os grupos de metilação. (C) Expressão gênica de *YAP1* nos TACs pediátricos de acordo com os grupos de metilação a partir dos dados de RNA-Seq da coorte FMRP/USP-Boldrini.

Tabela 8. Sondas de metilação anotadas ao gene *YAP1*, sua localização e valores médios de metilação nos grupos resultantes da análise de agrupamento não-supervisionado dados dos TACs da coorte pediátrica FMRP/USP-Boldrini.

			M-valor			
Sondas	Coordenadas*	Relacionada	Relacionada	Grupo 1	Grupo 2	<i>p</i> -valor ajustado
		ao gene	à CGI	(média)	(média)	
cg09612099	102096840	Body	-	1,488	0,254	2,03608E-10
cg05504411	102097274	Body	-	1,679	-0,194	2,2392E-10
cg13128280	102097528	Body	-	0,752	0,002	6,76423E-07
cg24576201	102097523	Body	-	0,543	-0,040	0,00249
cg08556511	102048882	Body	-	-0,146	-0,894	0,01070
cg20782778	101982138	Body	Island	-3,436	-3,296	0,01327
cg20988436	101982833	TSS1500	Shore	-3,144	-2,756	0,02164
cg04268312	102043542	Body	-	1,751	1,277	0,02196
cg07102435	102096771	Body	-	2,928	2,677	0,02576
cg27147938	102039379	Body	-	1,943	1,437	0,03306
cg17132051	102033094	Body	-	2,844	2,476	0,10396
cg22104427	102033860	Body	-	2,728	2,403	0,18422
cg06809604	101982988	TSS200	Shore	-2,896	-2,671	0,34020
cg22073838	101982817	TSS1500	Shore	-2,765	-2,568	0,36980
cg19154027	101983027	Body	Shore	-3,588	-3,506	0,56387
cg25321742	102100474	Body	-	-2,236	-2,141	0,56387
cg22381591	101982741	TSS1500	Shore	-4,105	-4,139	0,67024

* Referentes à versão GRCh37 do genoma humano. CGI: ilha CpG, TSS200: 0-200 bases à montante do ponto de início da transcrição (TSS), TSS1500: 200-1500 bases à montante do TSS, *Body:* entre o ATG e o códon de parada; independentemente da presença de íntrons, exons, TSS ou promotores, *Shore*: 0–2 kilobases a partir da ilha CpG. As diferenças nos valores de metilação entre os grupos foram calculadas por meio do teste *t* de Student.

Apesar dos níveis de metilação do gene *YAP1* não estarem associados à expressão do gene *YAP1* nos TACs avaliados, as assinaturas de metilação foram associadas à apresentação da doença e ao prognóstico dos pacientes pediátricos. Conforme demonstramos na **Tabela 9**, o grupo 1 de metilação foi enriquecido por pacientes que apresentaram doença avançada ou metastática ao diagnóstico (estádios III e IV, p=0,005) e por aqueles cujos tumores foram diagnosticados como de potencial de malignidade incerto ou carcinomas (**Escore de Wieneke ≥ 3**, p=0,009). Os pacientes do grupo 1 apresentaram maior frequência de recidiva ou metástase após a ressecção do tumor primário (p=0,019) e maior frequência de pacientes

que foram à óbito em decorrência da doença (p=0,032). Ainda, os pacientes deste grupo 1 apresentaram tanto sobrevida livre de doença quanto sobrevida total significativamente menores do que as dos pacientes do grupo 2 (**Figura 11**).

Tabela 9. Características prognósticas dos pacientes pediátricos com TAC provenientesda coorte FMRP/USP-Boldrini de acordo com o perfil de metilação do gene YAP1

Característica	Total	Grupo 1	Grupo 2	<i>p</i> -valor		
Pacientes, n (%)	59 (100)	36 (61)	23 (39)	-		
Procedência, n (%)				>0,99		
FMRP-USP	38 (64)	23 (64)	15 (65)			
Centro Infantil	21 (36)					
Boldrini		13 (36)	8 (35)			
Sexo, n (%)				0,391		
Feminino	42 (71)	24 (78)	18 (67)			
Masculino	17 (29)	12 (22)	5 (33)			
Idade ao diagnóstico (anos)						
Mediana	2	1,7	2,1	0,428		
IQR	1,4 – 3,8	1,1 - 6,8	1,5 - 3,2			
< 4 anos	45 (76)	26 (72)	19 (83)	0,532		
>4 anos	14 (24)	10 (28)	4 (17)			
Apresentação clínica, n (%)				0,783		
Assintomática	7(12)	4 (11)	3 (13)			
Sd. de Cushing	6 (10)	4 (11)	2 (9)			
Virilização	45 (76)	27 (75)	18 (78)			
Virilização e Sd. de	1 (2)	1 (2)	0			
Cushing		1 (5)	0			
Estádio tumoral, n (%)				0,005		
Ι	33 (56)	14 (39)	19 (83)			
Π	15 (24)	11 (31)	4 (17)			
III	5 (8)	5 (13)	0			
IV	6 (10)	6 (17)	0			
Diagnóstico histopatológico, n (%)						
Adenoma	25 (42)	10 (28)	15 (65)			
Malignidade incerta	14 (24)	9 (25)	5 (22)			

Carcinoma	16 (27)	14 (39)	2 (9)			
Não avaliados	4 (7)	3 (8)	1 (4)			
Recidiva pós-cirúrgica, n (%)						
Não	47 (80)	25 (69)	22 (96)	0,019		
Sim	12 (20)	11 (31)	1 (4)			
Mutação germinativa p53 p.R.	337H			0,392		
Sim	51 (86)	31 (86)	20 (87)			
Não	5 (8)	2 (6)	3 (13)			
Não avaliados	3 (6)	3 (8)	0			
Mutação somática CTNNB1 (é	éxon 3), n (%)			0,982		
Sim	7 (12)	3 (8)	4 (17)			
Não	48 (81)	30 (84)	18 (79)			
Não avaliados	4 (7)	3 (8)	1 (4)			
Seguimento (meses)				0,1		
Mediana	52,8	41,4	72			
IQR	16,8 - 92,8	12 – 90,3	33,6-115,6			
Desfecho, n (%)				0,032		
Doença em remissão	43 (73)	23 (64)	20 (87)			
Doença ativa	3 (5)	2 (6)	1 (4)			
Óbito	9 (15)	9 (25)	0			
Perda de seguimento	4 (7)	2 (6)	2 (9)			

N, número de indivíduos; %, porcentagem de indivíduos, IQR: intervalo interquartil. Pacientes cujas características não foram avaliadas ou que tiveram perda de seguimento não foram incluídos nas análises. As diferenças entre as variáveis contínuas e categóricas entre os grupos foram analisadas utilizando-se os testes Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis e exato de Fisher ou qui-quadrado, respectivamente.



do gene YAP1.



Curvas de Kaplan-Meier considerando o perfil de metilação do gene *YAP1* e sobrevida livre da doença (**A**) e sobrevida total (**B**) de pacientes pediátricos com TAC provenientes da coorte FMRP/USP-Boldrini.

O subgrupo de pacientes provenientes da coorte pediátrica do IPACTR/ GSE131350 foi avaliado no estudo prévio de Clay et al. (2019) (CLAY, *et al.*, 2019). Brevemente, a coorte compreendeu 35 meninas (72,9%) e 13 meninos. A mediana de idade ao diagnóstico foi 2,56 anos. A apresentação clínica predominante foi a virilização (n=24, 50%), seguida por virilização com síndrome de Cushing (n=12; 25%), síndrome de Cushing (n=6; 12,5%), apresentação assintomática (n=5; 10,4%). Vinte (41,7%) pacientes apresentaram doença avançada ao diagnóstico: não-localizada (estádio III: 31,3%) ou metastática, (estádio IV: 10,4%). Vinte e três TACs foram diagnosticados como AAC (47,9%), 5 como de potencial de malignidade incerto (10,4%), 19 como CAA (39,6%). A mediana de seguimento dos pacientes foi igual a 42,2 meses e até o momento 6 pacientes foram à óbito em decorrência da doença.

A análise de agrupamento não-supervisionada (UHCA) considerando os dados de metilação do gene *YAP1* também resultou na identificação de dois *clusters* (**Figura 12**), que foram designados como grupo 1' (n=14) e grupo 2' (n=34). Assim como observado em nossa casuística, as assinaturas de metilação de *YAP1* foram associadas à apresentação da doença. O grupo 1' estava enriquecido por pacientes que apresentaram doença avançada ou metastática ao diagnóstico (estádios III e IV: 57 vs 35%, p=0,017) e por aqueles cujos tumores foram

diagnosticados como de potencial de malignidade incerto ou carcinomas (**Escore de Wieneke \geq 3: 78 vs 39%**, p=0,024). Contudo, diferentemente de nossos resultados, as assinaturas de metilação de *YAP1* não foram associadas ao prognóstico do paciente, uma vez que não observamos diferenças nas frequências de pacientes com doença recidiva ou metastática após a ressecção do tumor primário (p=0,14) ou de pacientes que foram à óbito em decorrência da doença (p=0,39) e na sobrevida total dos pacientes do grupo 1' quando comparados aos do grupo 2' (Log-rank p=0,21).

Figura 12. Perfil de metilação do gene *YAP1* em TACs de pacientes pediátricos provenientes da coorte IPACTR/ GSE131350.



Dendograma resultante da análise de agrupamento não-supervisionada de 48 tumores adrenocorticais (TACs) pediátricos da coorte IPACTR/GSE131350 considerando os dados de metilação de 16 sondas

anotadas no gene *YAP1* pertencentes ao *EPIC Methylation Array* (Illumina) demonstrando 2 grupos de TAC e respectivo *heatmap* demonstrando os níveis individuais de metilação por sonda e por TAC.

4.2. Análise dos estudos in vitro

4.2.1. Análise da viabilidade celular após inibição farmacológica do YAP1

Avaliamos a proliferação das células H295R após o tratamento com doses crescentes de VP por até 72 horas e observamos sua redução de forma concentração- e tempo-dependente (**Figura 13A**). A concentração de VP capaz de inibir em 50% a proliferação destas células (IC50) após 48 horas de tratamento foi igual a 9,7 μ M. Dessa forma, utilizamos 10 μ M de VP nos experimentos subsequentes.

Com a finalidade de avaliarmos se a atividade antiproliferativa da VP seria específica em células com desregulação da beta-catenina, comparamos seus efeitos sobre a viabilidade celular nas linhagens H295R (com ativação da via Wnt/Beta-catenina), Hela (tumor de cérvix, sem alterações na beta-catenina) e Y1 (CAC de camundongo, sem ativação da beta-catenina). Observamos que a VP reduziu a viabilidade apenas das células H295R (**Figura 13B**), sugerindo que sua atividade sobre YAP1 ocorre especificamente em células adrenocorticais com ativação da via Wnt/beta-catenina.



Figura 13. Viabilidade celular após tratamento com verteporfina.

(A) Viabilidade da linhagem celular H295R após tratamento com concentrações crescentes de VP por até 72 horas. O IC50 calculado foi igual a 10 μ M em 48h. (B) Viabilidade das linhagens celulares H295R, HeLa e Y1 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com VP (10 μ M). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. *p<0,05, ***p<0,001; concentração *vs*. basal.

4.2.2. Análise da expressão da via Hippo após inibição farmacológica do YAP1

Após observarmos a redução da viabilidade da linhagem celular H295R pela VP, analisamos seu efeito sob a expressão dos genes da via Hippo e seus genes-alvo. Observamos aumento significativo na expressão dos genes do núcleo de quinases da via Hippo: *LATS1*, *STK3* (codifica para o MST2) e *STK4* (codifica para o MST1) (**Figura 14**). Por outro lado, observamos diminuição da expressão dos genes-alvo do YAP1: *CTGF* e *CYR61* (também conhecidos como *CCN2* e *CCN1*, respetivamente), e dos genes da família *TEAD1-4* (**Figura 14**).



Figura 14. Expressão gênica dos genes da via Hippo após tratamento com VP.

Expressão gênica dos genes da via Hippo após o tratamento com verteporfina (VP, 10μM) por 48 horas. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. *p<0,05, ***p<0,001.

É digno de nota que o tratamento com VP não interferiu na expressão do gene *YAP1* (**Figura 14**), mas sim na abundância das proteínas YAP1 e YAP1 fosforilada (Ser127), que foi reduzida (**Figura 15A**). Apesar de resultar em aumento da expressão do gene *STK1*, a expressão da proteína MST1 quinase não foi alterada pela VP (**Figura 15B**).

Figura 15. Expressão proteica de YAP1 e o YAP1 fosforilado após o tratamento com



Western blots demonstrando a expressão proteica de (A) YAP1 e YAP1 fosforilado (Ser127) e (B) MST1 cinase após o tratamento com verteporfina (VP 10 μ M). Todos os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. ** p <0,005.

Adicionalmente, observamos por meio de imunofluorescência que o tratamento com VP induziu a localização citoplasmática de YAP1 em detrimento da nuclear quando comparada ao tratamento controle (**Figura 16**).





Imagem representativa de imunofluorescência de células H295R após o tratamento com verteporfina (VP, 10 µM), indicando maior localização citoplasmática de YAP1 (vermelho). Os núcleos celulares foram marcados em azul com DAPI.

4.2.3. Análise do ciclo celular após silenciamento do gene YAP1

Após observarmos os efeitos da inibição farmacológica do YAP1 pela VP na proliferação celular e na expressão de genes da via HIPPO, avaliamos o efeito do silenciamento do gene *YAP1* sob a distribuição celular nas fases do ciclo celular bem como a expressão dos genes envolvidos na progressão do mesmo.

O silenciamento do gene *YAP1* foi confirmado por meio da avaliação de sua expressão gênica e proteica após a transfecção de si*YAP1*. Observamos redução superior a 50% da expressão do gene *YAP1* e da proteína YAP1 total e fosforilada pYAP1 (**Figura 17A e B**).

Figura 17. Efeito do silenciamento do gene YAP1 sob sua expressão gênica e proteica.



(A) Expressão do gene *YAP1* após seu silenciamento com si*YAP1*. (B) Western blot demonstrando a expressão proteica de YAP1 e YAP1 fosforilado (S127) após o silenciamento de *YAP1*. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. *** p <0,001.

O silenciamento do *YAP1* induziu o bloqueio da progressão das fases G0-G1 para a S e G2-M do ciclo celular (**Figura 18A**). Corroborando, observamos a diminuição da expressão gênica e proteica da ciclina D1, que é um dos principais marcadores da transição das fases G1-S (**Figura 18B** e **C**).



Figura 18. Análise de ciclo celular em células H295R após o silenciamento do gene

YAP1.

Efeito do silenciamento do gene *YAP1* sob a (**A**) distribuição das células H295R nas fases do ciclo celular e sob a expressão (**B**) gênica e (**C**) proteica do marcador de transição das fases G1-S ciclina D.

4.2.4. Análise da interação entre o YAP1 e a via Wnt/beta-catenina

Dadas as evidências da interação entre o YAP1 e a via Wnt, avaliamos os efeitos da inibição farmacológica do YAP1 com VP sob a beta-catenina na linhagem H295R. Observamos redução significativa tanto da expressão gênica quanto proteica da beta-catenina total (**Figura 19 A-C**). Observamos também redução importante do acúmulo nuclear de beta-catenina (**Figura 19 A e D**). Reforçando os resultados acima descritos, observamos que o tratamento com VP aboliu a expressão da ciclina D1, alvo canônico da beta-catenina (**Figura 19E**).

Figura 19. Efeito da inibição farmacológica do YAP1 sob a expressão da beta-catenina em células H295R.



(A) Imagem representativa da imunofluorescência de células H295R após o tratamento com verteporfina (VP, 10 μ M) demonstrando expressão citoplasmática e nuclear da beta-catenina (vermelho). Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). (B) Expressão do gene *CTNNB1* após o tratamento com VP 10 μ M. Western blots demonstrando a expressão (C) total e (D) nos compartimentos citoplasmático e nuclear de beta-catenina e (E) da ciclina D1, alvo da beta-catenina, após o tratamento com VP10 μ M. Todos os dados foram apresentados como média ± SEM. * p <0,05 e *** p <0,001.

Avaliamos também os efeitos do silenciamento do gene *YAP1* sob a sinalização da via Wnt/beta-catenina. Observamos o aumento da expressão do gene *CTNNB1* (Figura 20A), mas não da abundância da proteína beta-catenina (Figura 20B). Adicionalmente ao gene *CCND1*, que é um alvo canônico da beta-catenina cuja expressão foi reduzida pelo silenciamento do gene *YAP1* (Figura 18 B e C), avaliamos o gene-alvo *MYC*, mas não observamos efeito sob sua expressão (Figura 20A).

Figura 20. Efeito do silenciamento do gene *YAP1* sob a expressão de beta-catenina e seus alvos em células H295R.



Efeito do silenciamento do gene *YAP1* sob a (**A**) expressão do gene codificador da beta-catenina *CTNNB1* e dois de seus alvos *MYC* e *DVL3* e (**B**) sob a expressão proteica da beta-catenina em células H295R. Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. * p <0,05; ** p <0,005; *** p <0,001.

Avaliamos ainda se o DVL3 é afetado pela inibição do YAP1. Observamos redução de sua expressão proteica tanto após tratamento com VP quanto após o silenciamento do *YAP1* (**Figura 21A-B**), mesmo não havendo alteração de sua expressão gênica (**Figura 20A**).



Western blot demonstrando a expressão de DVL3 após o (**A**) silenciamento de *YAP1* e (**B**) o tratamento com 10 μ M de VP. Todos os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. * p <0,05.

Adicionalmente aos efeitos da inibição do *YAP1*, avaliamos os efeitos do silenciamento do gene *CTNNB1* sobre a via Hippo. Confirmamos o silenciamento por meio da diminuição da expressão do gene *CTNNB1*, da beta-catenina e dos seus genes-alvo *CCND1* e *MYC* (**Figura 22A-B**).

Não observamos diferenças na expressão dos genes das principais quinases da via Hippo (**Figura 22A**) ou da expressão gênica e proteica do *YAP1* (**Figura 22A-B**). Em contraste, a expressão do *CTGF*, um gene-alvo do YAP1, esteve significativamente elevada (**Figura 22A**).



Figura 22. Efeito do silenciamento do gene CTNNB1 na via Hippo em células H295R.

(A) Expressão dos genes da via Hippo, genes-alvo do YAP1, do *CTNNB1* e seus genes-alvo após o silenciamento de *CTNNB1*. (B) Western blots demonstrando a expressão de YAP1, YAP1 fosforilado (Ser127) e beta-catenina após o silenciamento do gene *CTNNB1*. Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. *p <0,05; **p <0,005; ***p <0,001.

4.2.5. Análise de marcadores de transição epitélio-mesênquima

Conforme observamos nas análises de enriquecimento de vias, o grupo de genes envolvidos na transição epitélio-mesenquimal (EMT) esteve enriquecido nos TACs com alta expressão de *YAP1*, tanto nas amostras de pacientes pediátricos quanto nas de adultos (**Figura 8**). Dessa forma, avaliamos o efeito da inibição do YAP1 sobre a abundância de marcadores mesenquimais como N-caderina e Vimentina, assim como seus fatores de transcrição SNAIL e TWIST. Os resultados de Western blot mostraram redução desses marcadores mesenquimais e de seus fatores de transcrição, tanto após a inibição farmacológica do YAP1 pela VP, quanto pelo silenciamento do gene *YAP1* (**Figura 23A-B**). Esses dados demonstraram o envolvimento

do YAP1 no processo de EMT e o potencial do tratamento com VP sobre uma possível reversão da EMT em células de CAC.



Figura 23. Efeito da inibição do YAP1 sobre a expressão de marcadores mesenquimais.

Efeito da inibição do YAP1 sobre a expressão de marcadores mesenquimais e **seus fatores de transcrição em células H295R**: (A) após silenciamento do gene *YAP1;* (B) após tratamento com VP (10 μ M).

4.2.6. Análise da invasão celular após inibição do YAP1

Considerando que a inibição de YAP1 parece estar envolvida na reversão do EMT, nós avaliamos seu efeito sobre a invasão de células H295R. Observamos redução significativa na percentagem de células com capacidade invasiva após o tratamento farmacológico com VP (100 ± 28 vs. $14,34 \pm 7$; p < 0,05; **Figura 24A**). O mesmo foi observado após o silenciamento do gene *YAP1* (**Figura 24B**).



Figura 24. Ensaio de Invasão celular após a inibição do YAP1 em células H295R.

Ensaio de invasão celular mostrando a percentagem de células com capacidade invasiva após tratamento com VP 10 μ M (**A**) ou silenciamento do gene *YAP1* (**B**). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. * p <0,05.

4.2.7. Análise do crescimento celular independente de ancoragem

O ensaio de crescimento celular independente de ancoragem mostra a capacidade de transformação celular. Observamos redução massiva da capacidade de transformação de células adrenocorticais H295R tanto após o tratamento com VP, quanto após o silenciamento do gene *YAP1* (Figura 25A e B, respectivamente). Esses resultados destacam o papel relevante do

YAP1 no processo de transformação celular, e o potencial da invasão das células de CAC ser resultante da regulação do processo de EMT.

Figura 25. Inibição do crescimento independente de ancoragem após inibição do YAP1 em células H295R.



Ensaio de formação de colônia em ágar mole após tratamento com VP (**A**) (10 μ M) e silenciamento do gene *YAP1* (**B**). Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. *** p <0,001.

4.3. Análise dos estudos in vivo

4.3.1. Inibição do crescimento tumoral

Observamos que o tratamento com VP restringiu o crescimento tumoral a partir da terceira semana de tratamento nos animais fêmeas quando comparado aos animais controle (controle: $251 \pm 53 vs$. VP: $121 \pm 33 mm^3$; p < 0,001). Ao final das 4 semanas de tratamento, o grupo tratado com VP apresentou redução de aproximadamente 50% do volume tumoral (controle: $356 \pm 69 vs$. VP: $184 \pm 59 mm^3$; p < 0,001) (Figura 26A-B). Houve correlação positiva entre o peso e volume tumorais (r = 0,93; p = 0.0001) (Figura 26C). Não observamos

diferença entre o volume tumoral dos camundongos machos nos grupos controle e tratado com VP.

Considerando os efeitos sistêmicos do tratamento com VP nos camundongos, observamos que não houve diferença significativa no peso dos animais tratados e não tratados (**Figura 26D**), o que corrobora com a tolerância dos animais à VP. Ainda, não observamos valores detectáveis de cortisol sérico.

Ao longo do experimento, quatro camundongos (2 machos e 2 fêmeas) do grupo controle morreram antes do término dos tratamentos. Dessa forma, apenas os tumores de dois camundongos (1 macho e 1 fêmea) deste grupo puderam ser coletados para as posteriores análises. Na **figura 26E** se encontra a curva de sobrevida dos animais desde o início até o término do tratamento, mostrando incremento da sobrevida dos camundongos tratados com VP quando comparados com os do grupo controle.

Macroscopicamente, não encontramos alterações tumorais sugestivas de metástases em outros órgãos como fígado, rins e pulmão.





(A) Curva de crescimento tumoral em camundongos fêmeas NSG. (B) Imagem representativa dos tumores após o tratamento com VP ou seu veículo DMSO; (C) Correlação entre peso e volume tumoral para todos os tumores dos camundongos analisados. r, coeficiente de correlação. (D) Curva de peso dos camundongos fêmeas ao longo do experimento. (E) Sobrevida total dos camundongos desde o início do tratamento até o final do tratamento (28 dias). * p<0,05 e *** p<0,005.

4.3.2. Histologia tumoral

As análises histológicas exibiram características semelhantes em ambos os grupos, incluindo áreas altamente proliferativas, demonstrado pela presença de mitoses frequentes e mitoses atípicas e poucos corpúsculos apoptóticos (**Figura 27**). Porém, nos tumores dos camundongos que foram tratados com VP se observou índice de Wieneke levemente menor comparado com o grupo controle.



Figura 27: Efeito do tratamento com verteporfina (VP) sobre a histologia dos xenoenxertos da linhagem tumoral adrenocortical H295R.

Imagens representativas das seções de xenoenxertos corados com H&E a partir dos camundongos controles (esquerda) e tratados com VP (direita). O painel superior mostra imagens representativas de mitoses (seta branca), mitoses atípicas (seta vermelha) e corpúsculos apoptóticos (seta preta). Magnificação 400x. Os painéis inferiores mostram extensas áreas necróticas em ambos os tratamentos. Magnificação,100x.

4.3.3. Proliferação tumoral

Nas análises de proliferação celular por imuno-histoquímica observamos que a percentagem de células positivas para o marcador Ki67 foi significativamente maior no grupo controle quando comparado ao grupo tratado com VP (11,8 vs 8,9; p=0,017) (**Figura 28 A-B**).

Figura 28: Efeito do tratamento com verteporfina (VP) sobre a proliferação celular dos xenoenxertos da linhagem tumoral adrenocortical H295R









(A) Imagens da marcação por imuno-histoquímica da proteína Ki67 das células obtidas dos tumores do modelo xenográfico murino, onde se observa marcação nuclear positiva para Ki67 no grupo controle e no grupo tratado com VP. (B) Percentagem de células Ki67 positivas nos tumores que foram tratados com VP e os controle.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. YAP1 é um marcador de pior prognóstico em pacientes com TAC

Expressão Elevada de YAP1 tem sido observada em diversos tipos de câncer, nos quais tem se mostrado fator chave na tumorigênese (DEY; VARELAS; GUAN, 2020; POMA et al., 2018). Na maioria desses tumores a elevada expressão do YAP1 e sua localização nuclear estão relacionadas com o prognóstico desfavorável dos pacientes (DEY; VARELAS; GUAN, 2020; KANG et al., 2011; LIU et al., 2013; SALCEDO ALLENDE et al., 2017; WANG et al., 2013; WU et al., 2016). Semelhante ao que foi encontrado em outros tipos de câncer, os resultados obtidos neste estudo indicam que a alta expressão de YAP1 está associada com menor sobrevida em pacientes pediátricos e adultos com tumor adrenocortical. Nossos dados atuais corroboram os dados apresentados previamente por Abduch et al. (2016) em parte da casuística de nossa coorte de pacientes pediátricos com TAC (ABDUCH et al., 2016) e expandem este achado ao validar a associação entre expressão elevada de YAP1 e pior desfecho nos pacientes do coorte do COG. Esta associação também foi confirmada na coorte de pacientes adultos com TAC avaliadas a partir dos dados públicos do TCGA. Nestes, observamos que a expressão mais elevada do YAP1 é um marcador independente de prognóstico desfavorável em pacientes com CAC. Esses dados são interessantes, considerando que os tumores adrenocorticais de pacientes pediátricos e adultos apresentam características específicas em vários aspectos. Contudo, nossos resultados mostram que eles apresentam semelhanças na expressão do marcador YAP1 e em sua capacidade de classificar os tumores com prognóstico desfavorável.

Em um estudo baseado em dados do TCGA, no qual foram avaliados 33 tipos diferentes de câncer, com um total de 9.125 tumores de pacientes adultos, a via Hippo foi indicada como uma das vias que frequentemente apresentam alterações genéticas em cânceres humanos. Estas alterações são do tipo amplificações e/ou deleções do *YAP1*, mutações de perda de função ou silenciamento epigenético dos genes supressores de tumores da via Hippo como *NF2*, *FAT1-4*, *TAOK1-3*, *WW45* e *LATS1/2* (SANCHEZ-VEGA et al., 2018; WANG et al., 2018). Entretanto, mutações no gene *YAP1* são relativamente raras nos diferentes tipos de câncer da coorte do TCGA (WANG et al., 2018). As amplificações no *YAP1* têm sido observadas mais frequentemente nos carcinomas de células escamosas com origem no pescoço, esôfago, pulmão e no colo uterino (DEY; VARELAS; GUAN, 2020; LORENZETTO et al., 2014; SANCHEZ-

VEGA et al., 2018). A presença de variantes genéticas no *YAP1* e demais genes da via Hippo tem TACs pediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini não foi avaliada e deverá ser alvo de investigação em estudo subsequente. Em nosso estudo, analisando os dados do TCGA não encontramos mutações nem alterações como amplificações ou deleções no *YAP1* nos CAC de pacientes adultos. Porém, encontramos mutações nos genes *FAT1, FAT3, FAT4* e *TAOK1*.

As proteínas FAT são caderinas transmembranas atípicas que modulam a ativação da via Hippo, provavelmente para iniciar a via de sinalização por contato (CHO et al., 2006; LI et al., 2018; MARTIN et al., 2018; SILVA et al., 2006). Alterações como perda de função de genes da família FAT são frequentes em diversos tipos de câncer humano (SANCHEZ-VEGA et al., 2018). Recentemente foi observado em modelo *in vivo* de carcinoma de células escamosas de pele e de pulmão, que a deleção de *FAT1* acelerou a iniciação e progressão de malignidade. Adicionalmente, a deleção de *FAT1* promoveu um fenótipo híbrido de EMT, que apresenta aumento de características de células tronco e de formação de metástases. Nessas células tumorais com *knockout* de *FAT1* foi observada superexpressão total e nuclear de YAP1, mostrando que a deleção de *FAT1* conduz a uma cascada de sinalização que promove a ativação de YAP1 e regula o estado mesenquimal observado nesses tumores (PASTUSHENKO et al., 2021).

Com a finalidade de tentar entender qual processo está envolvido no incremento da expressão do YAP1 nos TACs, avaliamos o estado de metilação do gene *YAP1* e suas regiões reguladoras. Observamos dois grupos de TACs com assinaturas de metilação distintas no gene *YAP1*. Entretanto estes grupos não diferiram quanto aos níveis de metilação ou à localização funcional dos sítios CpG diferencialmente metilados, majoritariamente anotados ao corpo do gene (*Body*). Em concordância com essas observações, não observamos diferenças nos níveis de expressão do gene *YAP1* entre os dois grupos distintos no padrão de metilação. Contudo, as assinaturas de metilação de *YAP1* foram associadas à apresentação da doença em duas coortes de pacientes pediátricos com TAC e ao prognóstico dos pacientes seguidos pela coorte FMRP/USP-Boldrini. Esses resultados, junto com os achados de alterações genéticas na via Hippo nos CAC de pacientes adultos indicam que provavelmente existem outros mecanismos envolvidos no aumento da expressão do YAP1.

Alguns outros mecanismos desreguladores da expressão do *YAP1* têm sido relatados. Entre eles estão o padrão de expressão de microRNAs, alterações em genes externos à via Hippo e o papel de oncoproteínas virais. Adicionalmente, foram encontradas fusões entre o *YAP1* e outras proteínas (PAJTLER et al., 2019; SZULZEWSKY; HOLLAND; VASIOUKHIN, 2021; TANAS et al., 2016). Todos os genes de fusão do YAP1 analisados até o momento se mostraram oncogênicos e funcionavam exercendo a atividade de YAP1 dependente do TEAD. Este achado foi evidenciado pela presença da mutação pontual S94A no gene *YAP1*, a qual remove a interação entre YAP e oTEAD. O papel tumorigênico destas fusões envolvendo o *YAP1* foi confirmado pela diminuição da atividade transcricional das proteínas de fusão e inibição do crescimento de células tumorais de camundongo *in vitro aa*pós seu tratamento com VP (SZULZEWSKY et al., 2020). Adicionalmente, estes genes de fusão se mostraram resistentes à sinalização inibitória da via Hippo. Em experimentos de RNA-Seq foi observado que os principais genes de fusão encontrados até o momento compartilham sua assinatura transcricional central, que se sobrepõe ao *YAP1* nativo (SZULZEWSKY et al., 2020)

5.2. Desregulação do YAP1 reduz a viabilidade celular de células adrenais

Em estudo prévio, Abduch *et al.* (2016) demonstraram viabilidade reduzida das células de CAC usando a linhagem celular H295R após o silenciamento do gene *YAP1* (ABDUCH et al., 2016). No presente estudo, reduzimos a atividade de YAP1 por meio do tratamento com 10 μ M de VP e também encontramos redução da viabilidade celular. A atividade aumentada do YAP1 tem sido observada em outros cânceres, como gliomas, fígado, ovário e tumores endometriais (AL-MOUJAHED et al., 2017; FENG et al., 2016; LIU-CHITTENDEN et al., 2012; WANG et al., 2015).

Os dados apresentados neste estudo são o primeiro relato da inibição do crescimento de células de carcinoma adrenocortical pelo tratamento com VP. É interessante ressaltar que, diferentemente das células H295R, quando avaliamos o efeito da VP em outra linhagem tumoral adrenal (Y1) e na linhagem HeLa, não observamos redução da viabilidade celular. Esta observação provavelmente está relacionada com a presença da mutação p.S45P no exon 3 no gene *CTNNB1*, que resulta na ativação constitutiva da beta-catenina na linhagem H295R (TISSIER et al., 2005). Em concordância com esta hipótese nas linhagens sem ativação da via Wnt/beta-catenina, como a Y`e a HeLa, este efeito não foi observado.

Rosenbluh *et al.* (2012) avaliaram linhagens celulares com a via Wnt/beta-catenina ativa e outras linhagens com esta via não ativa e demonstraram que as células com a via Wnt/beta-catenina ativa requerem a formação de um complexo com o YAP1 e o fator de transcrição TBX5 para o processo de transformação e sobrevida celular (ROSENBLUH et al., 2012). Neste sentido, a interação entre vias Hippo/YAP e Wnt/beta-catenina é importante no processo tumorigênico observado principalmente em tumores com beta-catenina ativa, como a maioria dos TACs. A redução da viabilidade celular observada no presente estudo está relacionada com a indução do bloqueio da progressão do ciclo celular na fase G0/G1. Isto foi evidenciado pela diminuição da expressão e abundância da ciclina D1 após inibição do YAP1, tanto farmacológica quanto por meio de silenciamento gênico. Ressalte-se que a ciclina D1 é um alvo direto da beta-catenina e, como grande parte dos TACs possuem ativação da via Wnt, o tratamento com inibidores de YAP1 tem potencial para se tornar uma opção terapêutica para estes pacientes.

5.3. Ativação da via Hippo e degradação do YAP1 após tratamento com VP

A atividade de YAP1 é regulada pela sua fosforilação e localização subcelular, de forma que as quinases da via Hippo fosforilam o seu resíduo Ser127 e induzem sua retenção citoplasmática e degradação, bloqueando sua atividade transcricional. Neste estudo, observamos que o tratamento com VP reduz a expressão proteica do YAP1 total e de sua forma fosforilada (S127), consequentemente, reduzindo sua atividade transcricional. Quando analisamos a expressão dos genes codificadores das principais quinases da via Hippo, notamos seu aumento após o tratamento com VP. Coletivamente, estes resultados sugerem a ativação da via Hippo e subsequente degradação do YAP1 pela VP. Contudo, estudos adicionais se fazem necessários para confirmar este achado. A ativação da via Hippo pela VP foi previamente relatada em células de câncer endometrial (DASARI et al., 2017). Neste estudo, os autores demonstraram incremento das expressões gênica e proteica de NF2 e LATS1 após o tratamento com VP, o que sugere que os efeitos da VP ocorrem também sobre os mediadores à montante da via Hippo por mecanismo ainda não elucidado.

5.4. Interação entre a via Hippo/YAP1 e a via Wnt-beta-catenina

A ativação da via Wnt/beta-catenina é frequente e observada na maioria dos TACs. Esta ativação é causada pormutações no gene *CTNNB1*, mutações no gene *ZNRF3* ou a outras alterações na via, como redução da expressão dos reguladores negativos da via Wnt/beta-catenina (ASSIÉ et al., 2014; BONNET et al., 2011; LEAL et al., 2011; TISSIER et al., 2005). Nossos resultados mostraram alta frequência de mutações no gene *CTNNB1* em CACs de pacientes adultos do TCGA com expressão alta do *YAP1*. Adicionalmente, por meio das análises de enriquecimento de vias observamos que tanto nas duas coortes pediátricas quanto na coorte adulta, o complexo beta-catenina/TCF se encontrou enriquecido positivamente nos pacientes com alta expressão de *YAP1*. Esses resultados indicam a interação das vias Wnt/beta-catenina e Hippo/YAP e sugerem que a desregulação do YAP1 e da beta-catenina está associada com prognóstico desfavorável dos pacientes, o que também tem sido evidenciado em outros tipos de tumores (QUINN et al., 2021; TAO et al., 2014).

YAP1 regula a sinalização da via Wnt/beta-catenina pela ação das proteínas DVL (BARRY et al., 2013; IMAJO et al., 2012; VARELAS et al., 2010). As DVLs fosforiladas servem como reguladores negativos cruciais do complexo de destruição-GSK3b, resultando na estabilização da beta-catenina (CLEVERS, 2006; NUSSE, 2005). Barry *et al.* (2013) mostraram que a expressão do YAP1 regula a expressão dos genes-alvo da via Wnt/beta-catenina por intermédio do DVL e que o silenciamento do *YAP1* resulta no acúmulo nuclear de DVL em células intestinais (BARRY et al., 2013). Adicionalmente, foi mostrado que, no núcleo, DVL interage com TCF por intermédio de c-Jun para promover a formação de um complexo quaternário entre beta-catenina/TCF/c-Jun/DVL e induzir a transcrição de genes-alvo de beta-catenina (GAN et al., 2008). No presente trabalho, encontramos que tanto o silenciamento de *YAP1* por meio de siRNA quanto sua inibição pela VP, reduziram a abundância de DVL, o que apoia o papel de regulação do YAP1 sobre a proteína DVL. Desta forma, a inibição do YAP1 poderia reduzir a transcrição da sensalvo da via Wnt/beta-catenina. Em acordo com esses resultados, observamos redução da expressão de Ciclina D1 após ambas as estratégias inibitórias de atividade YAP1, e consequentemente, de DVL.

Observamos que o silenciamento de YAP1 não resultou em diferença na expressão proteica da beta-catenina nas células H295R. Este achado pode estar relacionado à presença da mutação específica do CTNNB1 que gera uma troca do aminoácido Ser45. Estas trocas resultam em moléculas de beta-catenina que escapam do complexo de degradação citoplasmático, o qual requer a incorporação de YAP1 (AZZOLIN et al., 2014). Similar aos nossos resultados, outros dois grupos relataram que o knockdown ou knockout de YAP1 não alteram a estabilidade ou os níveis de beta-catenina (BARRY et al., 2013; ROSENBLUH et al., 2012). Por outro lado, observamos que o silenciamento de YAP1 reduz a atividade transcricional da mesma. Em células de câncer de cólon, foi mostrada a formação de um complexo nuclear entre YAP/betacatenina/TCF4 que induz a transcrição de genes como CCND1 e LGR5 (DENG et al., 2018). Adicionalmente, em um trabalho recente em linhagem celular de câncer de mama do tipo basal, foi observado que a inibição de YAP1 tanto pelo silenciamento quanto por tratamento farmacológico, diminui a expressão de alguns genes alvo da beta-catenina (QUINN et al., 2021). Nesse mesmo trabalho, por meio de ChIP-seq, foi observada a interação entre YAP/TEAD e CTNNB1 em regiões promotoras ou enhancers de genes alvo em comum, o que indicaria que TEAD, CTNNB1 e YAP1 interagem e podem estar colocados em enhancers ou promotores gênicos de ambos (QUINN et al., 2021). Por outro lado, no presente estudo, quando a atividade de YAP1 foi reduzida pelo tratamento com VP, observamos redução da atividade transcricional da beta-catenina e degradação da mesma. Esse resultado pode ser devido à ubiquitinação em outro ponto de fosforilação, conduzindo consequentemente a sua degradação. Dada a propriedade regulatória de YAP1 sobre a atividade transcricional da beta-catenina, estudamos o efeito do silenciamento do gene CTNNB1 para ver a interação entre estas vias. Observamos que o silenciamento de CTNNB1 promove ativação transcricional de YAP1, mas não encontramos diferenças na abundância ou níveis de expressão de YAP1 nas células adrenocorticais. Por outro lado, Konsavage et al. (2012) mostraram que a inibição de CTNNB1 por shRNA em células de câncer de cólon reduziu a expressão de YAP1 e de seus genes alvos. Os autores demonstraram que a beta-catenina e o TCF se unem na região upstream da sequência de YAP1, para ativar a expressão gênica de YAP1 e incrementar seus níveis proteicos (KONSAVAGE et al., 2012). Ambos os resultados, apesar de opostos, indicam a beta-catenina como um regulador transcricional de YAP1. Desde que as linhagens celulares usadas pelo estudo de Konsavage et al. (2012) e no estudo atual apresentam alguma alteração na via Wnt/beta-catenina que promove a estabilidade da beta-catenina, poderíamos hipotetizar que

diferenças entre estes estudos seriam por conta da regulação transcricional tecido-específica do YAP1.

Nossos resultados reforcam a interação entre a beta-catenina e o YAP1 na tumorigênese adrenocortical, bem como o processo de regulação entre as vias, o qual já tem sido evidenciado em vários tipos de câncer (KONSAVAGE et al., 2012; QUINN et al., 2021; ROSENBLUH et al., 2012; TAO et al., 2014). Essa interação estaria relacionada com a incorporação do YAP1 no complexo de degradação da beta-catenina em nível citoplasmático, conforme descrito previamente em outros tipos celulares, onde o knockout de YAP resulta na ativação da betacatenina e compensa a perda da sinalização Wnt (AZZOLIN et al., 2014). Por outro lado, no estudo de Quinn et al (2021) foi observado que YAP1 pode controlar a atividade de betacatenina no núcleo por meio da interação nas regiões reguladoras de genes alvo da beta-catenina e por regular a translocação nuclear. Este dado demonstraria que o YAP1 seria necessário para a atividade nuclear da beta-catenina no câncer de mama tipo basal (QUINN et al., 2021). Avaliando células epiteliais gástricas, foi evidenciado que YAP nuclear promove a translocação da fosfatase SHP2 para o núcleo, onde vai atuar na transcrição de beta-catenina. De forma opostas, quando YAP está no citoplasma e fosforilado, ele sequestra SHP2 e evita a transcrição de beta-catenina (TSUTSUMI et al., 2013). Neste sentido, tem se especulado que no núcleo, YAP e beta-catenina se ligam para ativar a transcrição de genes em comum, mas no citoplasma poderiam estar associados negativamente (TSUTSUMI et al., 2013). Assim, a regulação da expressão de genes alvo da beta-catenina pelo YAP seria contexto e tecido específico. Porém, ainda faltam mais estudos que permitam conhecer os mecanismos pelos quais a interação direta entre YAP e beta-catenina regula a atividade da beta-catenina e do YAP.

5.5. Inibição do crescimento independente de ancoragem celular após inibição do YAP1

A ruptura entre a interação célula-célula ou célula-ECM conduz a uma forma de morte celular apoptótica chamada *anoikis* (FRISCH; FRANCIS, 1994). Este mecanismo de morte celular permite prevenir o crescimento de células independente de aderência ou interação com alguma matriz extracelular, uma característica da transformação celular, evitando assim a
colonização de órgãos distantes. Como o crescimento independente de ancoragem e a EMT são passos essenciais para a progressão do câncer e a colonização metastática, a capacidade das células cancerígenas de resistir ao processo de *anoikis* é importante, já que muitas destas células conseguem evadir este mecanismo e crescem descontroladamente em diferentes locais, permitindo assim invasão, metástase, resistência a terapias e recidiva (PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013). Em diferentes tipos de câncer foi mostrado que YAP1 promove o crescimento independente de ancoragem, e que sua inibição reduz este processo, conforme observado pela redução da formação de colônias em ágar mole (CHANG et al., 2019; HUA et al., 2016; ROSENBLUH et al., 2012). Adicionalmente, tem se mostrado que a expressão aumentada ou o acúmulo nuclear de beta-catenina — resultante de mutações que afetam sua degradação — conferem a resistência ao *anoikis* e capacita as células a crescerem independente de ancoragem, resultando em fenótipo mesenquimal estável (ORFORD; ORFORD; BYERS, 1999).

Em nosso estudo demonstramos que a desregulação do YAP1, tanto pelo silenciamento de *YAP1* como pelo tratamento farmacológico com VP, foi suficiente para inibir o crescimento independente de ancoragem, indicando o YAP1 como um componente importante para este processo de transformação em células adrenocorticais com ativação de beta-catenina. Estes resultados estão em concordância com os achados de Rosenbluh *et al.* (2012) que avaliaram linhagens celulares com beta-catenina ativa e não-ativa, e demonstraram que as células com beta-catenina ativa requerem a formação de um complexo com YAP1 e o fator de transcrição TBX5 para o processo de transformação e sobrevida celular (ROSENBLUH et al., 2012). Por outro lado, Salomon *et al.* (2015) demonstraram que o silenciamento do gene *CTNNB1* resultou na redução da transformação das células adrenocorticais (SALOMON et al., 2015). Desse modo, nossos resultados mostram que YAP1 tem um papel importante na transformação nas células adrenocorticais e que possivelmente este mecanismo se deve à cooperação entre YAP1 e beta-catenina.

5.6. Efeito da inibição da atividade de YAP1 sobre a invasão celular e os marcadores mesenquimais

Em muitos tumores tem sido mostrado que a maior expressão do YAP1 está associada com invasão e propriedades alteradas da matriz extracelular (LIN et al., 2015; ZANCONATO; CORDENONSI; PICCOLO, 2016). Nossos resultados in silico mostraram que, tanto na coorte adulta do TCGA quanto nas pediátricas COG e FMRP/USP-Boldrini de TAC, a alta expressão de YAP1 foi associada a processos de degradação da matriz celular e colágeno e regulação negativa da adesão celular. Estes mecanismos são importantes para o remodelamento da matriz extracelular, permitindo assim o movimento ativo de células através da matriz intersticial durante a migração celular (WINKLER et al., 2020). In vitro, observamos que a inibição da atividade de YAP1 foi capaz de reduzir o processo de invasão de células adrenais tumorais. Em um estudo feito in vitro e in vivo com células de melanoma, foi evidenciado que YAP1 é requerido para a invasão celular de melanoma e que sua hiperatividade pode ativar as células de melanoma de fenótipos proliferativo para fenótipo invasivo. Nesse mesmo estudo, a hiperatividade de YAP1 promoveu metástase espontânea de melanoma em modelo xenográfico murino (ZHANG et al., 2020). Recentemente foi desenhado um YAP1 foto-ativável (optoYAP) que permite controlar no espaço-tempo a ativação do YAP. Assim, usando esferóides das linhagens celulares HeLa e A431 (carcinoma epidermoide) demostrou-se que a translocação nuclear de YAP1 é capaz de acionar a invasão dos esferóides para a matriz circundante (ILLES et al., 2021).

Adicionalmente a transformação oncogênica, em vários tipos de câncer foi observado que YAP1 tem um papel importante no processo de EMT, que é um evento chave para promover a migração das células tumorais estacionárias e invasão em outros tecidos, conduzindo assim à metástase (LIU et al., 2021; YEUNG; YANG, 2017). Em nossa análise de enriquecimento de vias observamos que o conjunto de genes associados com o processo de EMT foi enriquecido positivamente nos tumores onde o *YAP1* foi mais expresso, independentemente da idade do paciente. Especificamente em TACs, pouco é conhecido acerca do processo de metástase e EMT. Bulzico *et al.* (2017) avaliaram a expressão de marcadores de EMT em tecidos adrenocorticais normais, AAC e CAC em adultos e em TAC pediátrico (BULZICO et al., 2017) e mostraram baixa expressão de e-caderinas em todas as amostras. Em contraste, a expressão do marcador mesenquimal vimentina e do fator de transcrição mesenquimal TWIST, foi observada em todas as amostras, incluindo em adrenais normais. Contudo, a vimentina e o TWIST foram mais expressos em TACs pediátricos, sendo o último especialmente hiper expresso nos CACs (BULZICO et al., 2017). Em outro trabalho recente, Sbiera *et al* (2021) avaliaram adrenais normais, AACs e CACs de pacientes adultos e também não observaram expressão aumentada da e-caderina nestes tecidos comparados com tecidos não-adrenais. Neste trabalho, os autores avaliaram marcadores mesenquimais diferentes daqueles avaliados por Bulzico *et al.* (2017), como a N-caderina e os fatores de transcrição SLUG e SNAIL, e observaram, nos CAC, associação positiva entre a expressão de SLUG e marcadores clínicos de agressividade, mas correlação negativa entre a expressão de N-caderina e estes marcadores (SBIERA et al., 2021). Os resultados de ambos estes estudos em relação à expressão dos marcadores epiteliais como e-caderina eram esperados (BULZICO et al., 2017; SBIERA et al., 2021) pois os tecidos adrenocorticais são mais semelhantes aos tecidos mesenquimais do que aos epiteliais. Este fato, pode ser devido à sua origem a partir do mesoderma intermediário durante a embriogênese, porém uma vez em processo de reversão EMT, passa a resultar em tecido epitelial (XING et al., 2015). Contudo, parece que esta transformação epitelial é incompleta e, assim, o córtex adrenal mantém muitas das características mesenquimais em nível molecular (SBIERA et al., 2021).

Em nosso estudo, não detectamos a expressão da e-caderina nas células adrenais (dados não mostrados) e observamos que a vimentina, incrementada nas células adrenais, foi reduzida após o silenciamento de *YAP1* e o tratamento com VP. Adicionalmente, a inibição do YAP1 mostrou redução do marcador mesenquimal N-caderina e dos fatores de transcrição associados a EMT: TWIST e SNAIL. Entretanto, ainda não é claro se os TACs podem apresentar o processo de EMT. Nós hipotetizamos que estes tumores, por terem características mais mesenquimais que epiteliais, podem fazer outro processo semelhante a EMT, o que permitiria uma mudança de fenótipo e resultaria no processo de metástase. Nossos resultados indicam o envolvimento de YAP1 na capacidade das células de TAC a adquirir características mais mesenquimais e que, em conjunto com os dados aqui apresentados —redução da invasão celular e inibição do crescimento independente de ancoragem após a inibição da atividade do YAP1 —renderiam o YAP1 como um potencial alvo terapêutico em TACs mais agressivos com características.

5.7. Inibição do crescimento tumoral in vivo

Observamos que o tratamento com VP reduz consideravelmente o crescimento tumoral no modelo xenográfico murino avaliado. Observamos também diminuição da proliferação celular nesses tumores, o que foi evidenciado pela redução da imunorreatividade nuclear do marcador Ki-67. A redução do crescimento tumoral pela VP tem sido observada em linhagens celulares derivadas de outros tumores como câncer gástrico (GIRAUD et al., 2020; KANG et al., 2017), de cólon (ZHANG et al., 2015), hepatocarcinoma (LIU-CHITTENDEN et al., 2012), endometrial (BANG et al., 2019) entre outros (WEI; LI, 2020). Adicionalmente, outros estudos mostraram que a terapia combinada entre VP e outros agentes como gencitabina em adenocarcinoma pancreático ductal (DONOHUE et al., 2013) ou com o inibidor de pan-RAF LY3009120 em câncer pancreático (ZHAO et al., 2017) reduziu o crescimento tumoral.

Este primeiro estudo pré-clínico mostra, portanto, que a inibição do YAP1 inibe a progressão tumoral dos CACs. Desta forma tratamentos que possam inibir sua transcrição ou terapia combinada na qual se iniba também a beta-catenina, seriam potenciais regimes terapêuticos para pacientes com CAC, principalmente aqueles que apresentam maior agressividade.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A alta expressão do gene *YAP1* está associada ao prognóstico desfavorável de pacientes adultos e pediátricos com TAC.
- Existe interação entre o YAP1 e beta-catenina, na qual o YAP1 parece regular a transcrição da via Wnt/beta-catenina na linhagem adrenocortical H295R.
- A inibição do YAP1 inibe a proliferação, a invasão e a transformação celular, bem como a expressão de marcadores mesenquimais na linhagem adrenocortical H295R.
- A inibição do YAP1 pelo tratamento farmacológico com VP reduz o crescimento tumoral em modelo xenográfico murino de CAC.

7. Referências

7. REFERÊNCIAS

ABDUCH, R. H. et al. Unraveling the expression of the oncogene YAP1, a Wnt/beta-catenin target, in adrenocortical tumors and its association with poor outcome in pediatric patients. **Oncotarget**, v. 7, n. 51, p. 84634–84644, 1 out. 2016.

AL-MOUJAHED, A. et al. Verteporfin inhibits growth of human glioma in vitro without light activation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7602, 8 ago. 2017.

ANTONINI, S. R. R. et al. Tumores adrenocorticais na criança: da abordagem clínica à avaliação molecular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, p. 599–606, nov. 2011.

ANTONINI, S. R. R.; LEAL, L. F.; CAVALCANTI, M. M. Pediatric adrenocortical tumors: diagnosis, management and advancements in the understanding of the genetic basis and therapeutic implications. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**, v. 9, n. 5, p. 445–464, 2014.

ANTONINI, S. R.; STECCHINI, M. F.; RAMALHO, F. S. Chapter 36 - Development and Function of the Adrenal Cortex and Medulla in the Fetus and Neonate. Em: KOVACS, C. S.; DEAL, C. L. (Eds.). Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 611–623.

ARYEE, M. J. et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. **Bioinformatics**, v. 30, n. 10, p. 1363–1369, 15 maio 2014.

ASSIÉ, G. et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. **Nature Genetics**, v. 46, n. 6, p. 607–612, jun. 2014.

AVRUCH, J.; ZHOU, D.; BARDEESY, N. YAP oncogene overexpression supercharges colon cancer proliferation. **Cell Cycle**, v. 11, n. 6, p. 1090–1096, 15 mar. 2012.

AZZOLIN, L. et al. YAP/TAZ Incorporation in the β -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response. **Cell**, v. 158, n. 1, p. 157–170, 3 jul. 2014.

BANG, L. G. et al. Differential gene expression induced by Verteporfin in endometrial cancer cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3839, 7 mar. 2019.

BARRY, E. R. et al. Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. **Nature**, v. 493, n. 7430, p. 106–110, jan. 2013.

BEDROSE, S. et al. Adjuvant Therapy in Adrenocortical Carcinoma: Reflections and Future Directions. **Cancers**, v. 12, n. 2, p. 508, fev. 2020.

BONNET, S. et al. Wnt/β-Catenin Pathway Activation in Adrenocortical Adenomas Is Frequently due to Somatic CTNNB1-Activating Mutations, Which Are Associated with Larger and Nonsecreting Tumors: A Study in Cortisol-Secreting and -Nonsecreting Tumors. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 2, p. E419–E426, 1 fev. 2011.

BORGES, K. S. et al. Wnt/ β -catenin activation cooperates with loss of p53 to cause adrenocortical carcinoma in mice. **Oncogene**, v. 39, n. 30, p. 5282–5291, 23 jul. 2020.

BUENO, A. C. et al. Vitamin D receptor hypermethylation as a biomarker for pediatric adrenocortical tumors. **European Journal of Endocrinology**, v. 186, n. 5, p. 573-585, 1 mar. 2022.

BULZICO, D. et al. Is there a role for epithelial-mesenchymal transition in adrenocortical tumors? **Endocrine**, v. 58, n. 2, p. 276–288, 1 nov. 2017.

CAMARGO, F. D. et al. YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. **Current Biology**, v. 17, n. 23, p. 2054–2060, 4 dez. 2007.

CHANG, Y. et al. Activated hippo signal pathway inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in NK/T cell lymphoma cells. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 8, p. 3892–3904, 2019.

CHEN, Q. et al. A temporal requirement for Hippo signaling in mammary gland differentiation, growth, and tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 28, n. 5, p. 432–437, 1 mar. 2014.

CHO, E. et al. Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. **Nature Genetics**, v. 38, n. 10, p. 1142–1150, out. 2006.

CLAY, M. R. et al. DNA Methylation Profiling Reveals Prognostically Significant Groups in Pediatric Adrenocortical Tumors: A Report From the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **JCO Precision Oncology** v3, p. 1-21, 2019.

CLAY, M. R. et al. Pathological and Genetic Stratification for Management of Adrenocortical Carcinoma. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 107, n. 4, p. 1159–1169, 1 abr. 2022.

CLEVERS, H. Wnt/β-Catenin Signaling in Development and Disease. Cell, v. 127, n. 3, p. 469–480, 3 nov. 2006.

DASARI, V. R. et al. Verteporfin exhibits YAP-independent anti-proliferative and cytotoxic effects in endometrial cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 17, p. 28628–28640, 22 fev. 2017.

DENG, F. et al. YAP triggers the Wnt/β-catenin signalling pathway and promotes enterocyte self-renewal, regeneration and tumorigenesis after DSS-induced injury. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, fev. 2018.

DEY, A.; VARELAS, X.; GUAN, K.-L. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 7, p. 480–494, jul. 2020.

DIGIAMMARINO, E. L. et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 1, p. 12–16, 1 jan. 2002.

DONOHUE, E. et al. The Autophagy Inhibitor Verteporfin Moderately Enhances the Antitumor Activity of Gemcitabine in a Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Model. **Journal of Cancer**, v. 4, n. 7, p. 585–596, 2013.

DU, P. et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 587, 30 nov. 2010.

EL WAKIL, A.; LALLI, E. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 332, n. 1, p. 32–37, 30 jan. 2011.

ELSE, T. et al. Adrenocortical Carcinoma. **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 2, p. 282–326, 1 abr. 2014.

FASSNACHT, M.; ALLOLIO, B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, Disorders of the Adrenal Gland. v. 23, n. 2, p. 273–289, 1 abr. 2009.

FASSNACHT, M.; KROISS, M.; ALLOLIO, B. Update in Adrenocortical Carcinoma. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 12, p. 4551–4564, 1 dez. 2013.

FENG, J. et al. Verteporfin, a suppressor of YAP–TEAD complex, presents promising antitumor properties on ovarian cancer. Disponível em: https://www.dovepress.com/verteporfin-a-suppressor-of-yapndashtead-complex-presents-promising-an-peer-reviewed-article-OTT>. Acesso em: 8 fev. 2019.

FERNANDEZ-L, A. et al. YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. **Genes & Development**, v. 23, n. 23, p. 2729–2741, 1 dez. 2009.

FRANÇA, M. M. et al. POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression in human adrenocortical tumor cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Fifteenth Conference on the Adrenal Cortex (Adrenal 2012) League City, Texas June 19 – 22, 2012. v. 371, n. 1, p. 140–147, 22 maio 2013.

FRISCH, S.; FRANCIS, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 4, p. 619–626, 15 fev. 1994.

GAN, X. et al. Nuclear Dvl, c-Jun, β -catenin, and TCF form a complex leading to stabiLization of β -catenin–TCF interaction. **Journal of Cell Biology**, v. 180, n. 6, p. 1087–1100, 17 mar. 2008.

GAUJOUX, S. et al. Silencing Mutated β -Catenin Inhibits Cell Proliferation and Stimulates Apoptosis in the Adrenocortical Cancer Cell Line H295R. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55743, 2 jul. 2013.

GIRAUD, J. et al. Verteporfin targeting YAP1/TAZ-TEAD transcriptional activity inhibits the tumorigenic properties of gastric cancer stem cells. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 8, p. 2255–2267, 2020.

HATANO, O. et al. Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. **Genes to Cells**, v. 1, n. 7, p. 663–671, 1996.

HE, T.-C. et al. Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. **Science**, v. 281, n. 5382, p. 1509–1512, 4 set. 1998.

HESCOT, S. et al. Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells. **Endocrine-Related Cancer**, v. 20, n. 3, p. 371–381, 1 jun. 2013.

HUA, G. et al. YAP induces high-grade serous carcinoma in fallopian tube secretory epithelial cells. **Oncogene**, v. 35, n. 17, p. 2247–2265, abr. 2016.

ILLES, B. et al. Spatio-selective activation of nuclear translocation of YAP with light directs invasion of cancer cell spheroids. **iScience**, v. 24, n. 3, 19 mar. 2021.

IMAJO, M. et al. A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ β -catenin signalling. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 5, p. 1109–1122, 7 mar. 2012.

ISHIMOTO, H.; JAFFE, R. B. Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 3, p. 317–355, 1 jun. 2011.

JEFFERS, J. R. et al. The Common Germline TP53-R337H Mutation Is Hypomorphic and Confers Incomplete Penetrance and Late Tumor Onset in a Mouse Model. **Cancer Research**, v. 81, n. 9, p. 2442–2456, 1 maio 2021.

JIANG, N. et al. In vivo quantitative phosphoproteomic profiling identifies novel regulators of castration-resistant prostate cancer growth. **Oncogene**, v. 34, n. 21, p. 2764–2776, maio 2015.

KANG, M.-H. et al. Verteporfin inhibits gastric cancer cell growth by suppressing adhesion molecule FAT1. **Oncotarget**, v. 8, n. 58, p. 98887–98897, 19 out. 2017.

KANG, W. et al. Yes-Associated Protein 1 Exhibits Oncogenic Property in Gastric Cancer and Its Nuclear Accumulation Associates with Poor Prognosis. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 8, p. 2130–2139, 14 abr. 2011.

KERKHOFS, T. M. A. et al. Adrenocortical carcinoma: A population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 11, p. 2579–2586, 1 jul. 2013.

KHORRAM-MANESH, A. et al. Adrenocortical Carcinoma: Surgery and Mitotane for Treatment and Steroid Profiles for Follow-up. **World Journal of Surgery**, v. 22, n. 6, p. 605–612, 1 jun. 1998.

KONSAVAGE, W. M. et al. Wnt/β-Catenin Signaling Regulates Yes-associated Protein (YAP) Gene Expression in Colorectal Carcinoma Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 15, p. 11730–11739, 6 abr. 2012.

KONSTANTINOU, E. K. et al. Verteporfin-induced formation of protein cross-linked oligomers and high molecular weight complexes is mediated by light and leads to cell toxicity. **Scientific Reports**, v. 7, p. 46581, 21 abr. 2017.

LATRONICO, A. C. et al. An Inherited Mutation Outside the Highly Conserved DNA-Binding Domain of the p53 Tumor Suppressor Protein in Children and Adults with Sporadic Adrenocortical Tumors. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4970–4973, 1 out. 2001.

LAU, S. K.; WEISS, L. M. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. **Human Pathology**, v. 40, n. 6, p. 757–768, 1 jun. 2009.

LEAL, L. F. et al. Wnt/β-Catenin Pathway Deregulation in Childhood Adrenocortical Tumors. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 10, p. 3106–3114, 1 out. 2011.

LEAL, L. F. et al. Inhibition of the Tcf/beta-catenin complex increases apoptosis and impairs adrenocortical tumor cell proliferation and adrenal steroidogenesis. **Oncotarget**, v. 6, n. 40, p. 43016–43032, 16 out. 2015.

LEE, C. et al. Tumor metastasis to lymph nodes requires YAP-dependent metabolic adaptation. **Science**, v. 363, n. 6427, p. 644–649, 8 fev. 2019.

LEVASSEUR, A. et al. Targeted Disruption of YAP and TAZ Impairs the Maintenance of the Adrenal Cortex. **Endocrinology**, v. 158, n. 11, p. 3738–3753, 1 nov. 2017.

LI, Z. et al. Loss of the FAT1 Tumor Suppressor Promotes Resistance to CDK4/6 Inhibitors via the Hippo Pathway. **Cancer Cell**, v. 34, n. 6, p. 893- 905.e8, 10 dez. 2018.

LIBÈ, R.; FRATTICCI, A.; BERTHERAT, J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. **Endocrine-Related Cancer**, v. 14, n. 1, p. 13–28, 1 mar. 2007.

LIN, C.-H. et al. Microenvironment rigidity modulates responses to the HER2 receptor tyrosine kinase inhibitor lapatinib via YAP and TAZ transcription factors. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 22, p. 3946–3953, 5 nov. 2015.

LIPPERT, J. et al. Targeted Molecular Analysis in Adrenocortical Carcinomas: A Strategy Toward Improved Personalized Prognostication. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 12, p. 4511–4523, 1 dez. 2018.

LIU, J.-Y. et al. Overexpression of YAP 1 contributes to progressive features and poor prognosis of human urothelial carcinoma of the bladder. **BMC Cancer**, v. 13, n. 1, p. 349, 19 jul. 2013.

LIU, X. et al. EMT and Cancer Cell Stemness Associated With Chemotherapeutic Resistance in Esophageal Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021.

LIU-CHITTENDEN, Y. et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD–YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. **Genes & Development**, v. 26, n. 12, p. 1300–1305, 15 jun. 2012.

LIVAK, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. v. 25, n. 4, p. 402-408. 2001.

LORENZETTO, E. et al. YAP1 acts as oncogenic target of 11q22 amplification in multiple cancer subtypes. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2608–2621, 23 mar. 2014.

LUGHEZZANI, G. et al. The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: A North American validation. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 4, p. 713–719, 1 mar. 2010.

MANSMANN, G. et al. The Clinically Inapparent Adrenal Mass: Update in Diagnosis and Management. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 2, p. 309–340, 1 abr. 2004.

MARTIN, D. et al. Assembly and activation of the Hippo signalome by FAT1 tumor suppressor. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2372, 9 jul. 2018.

MCATEER, J. P.; HUACO, J. A.; GOW, K. W. Predictors of survival in pediatric adrenocortical carcinoma: A Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program study. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 48, n. 5, p. 1025–1031, 1 maio 2013.

MERMEJO, L. M. et al. Altered expression of noncanonical Wnt pathway genes in paediatric and adult adrenocortical tumours. **Clinical Endocrinology**, v. 81, n. 4, p. 503–510, 2014.

MICHALKIEWICZ, E. et al. Clinical and Outcome Characteristics of Children With Adrenocortical Tumors: A Report From the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 5, p. 838–845, 1 mar. 2004.

MONTICONE, S.; AUCHUS, R. J.; RAINEY, W. E. Adrenal disorders in pregnancy. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 11, p. 668–678, nov. 2012.

MOOTHA, V. K. et al. PGC-1α-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nature Genetics**, v. 34, n. 3, p. 267–273, jul. 2003.

MOREIRA, A.C.; ELIAS, L.L. Pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone in different degrees of adrenal 21-hydroxylase deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 74, p. 198-203, 1992.

NUSSE, R. Wnt signaling in disease and in development. **Cell Research**, v. 15, n. 1, p. 28–32, jan. 2005.

ORFORD, K.; ORFORD, C. C.; BYERS, S. W. Exogenous Expression of [№]-Catenin Regulates Contact Inhibition, Anchorage-independent Growth, Anoikis, and Radiation-induced Cell Cycle Arrest. **The Journal of Cell Biology**, v. 146, p. 13, 1999. PAJTLER, K. W. et al. YAP1 subgroup supratentorial ependymoma requires TEAD and nuclear factor I-mediated transcriptional programmes for tumorigenesis. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 3914, 1 dez. 2019.

PAOLI, P.; GIANNONI, E.; CHIARUGI, P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3481–3498, 1 dez. 2013.

PARK, J.; JEONG, S. Wnt activated β -catenin and YAP proteins enhance the expression of non-coding RNA component of RNase MRP in colon cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 33, p. 34658–34668, 22 set. 2015.

PASTUSHENKO, I. et al. Fat1 deletion promotes hybrid EMT state, tumour stemness and metastasis. **Nature**, v. 589, n. 7842, p. 448–455, jan. 2021.

PIDSLEY, R. et al. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 208, 7 out. 2016.

PIGNATTI, E.; FLÜCK, C. E. Adrenal cortex development and related disorders leading to adrenal insufficiency. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 527, p. 111206, 1 maio 2021.

PINTO, E. M. et al. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 48, p. 647–650, out. 2004.

PINTO, E. M.; ZAMBETTI, G. P.; RODRIGUEZ-GALINDO, C. Pediatric adrenocortical tumours. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, Adrenal tumours. v. 34, n. 3, p. 101448, 1 maio 2020.

POMA, A. M. et al. Hippo pathway affects survival of cancer patients: extensive analysis of TCGA data and review of literature. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10623, 13 jul. 2018.

PUGLISI, S. et al. New perspectives for mitotane treatment of adrenocortical carcinoma. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, Adrenal tumours. v. 34, n. 3, p. 101415, 1 maio 2020. QUINN, H. M. et al. YAP and β -Catenin Cooperate to Drive Oncogenesis in Basal Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 81, n. 8, p. 2116–2127, 15 abr. 2021.

REINCKE, M. et al. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 78, n. 3, p. 790–794, 1 mar. 1994.

RIBEIRO, R. C. et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9330–9335, 31 jul. 2001.

RIBEIRO, R. C. et al. The International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry initiative: Contributions to clinical, biological, and treatment advances in pediatric adrenocortical tumors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Adrenal Cancer: Scientific Advances special edition. v. 351, n. 1, p. 37–43, 31 mar. 2012.

RIBEIRO, R. C.; FIGUEIREDO, B. Childhood adrenocortical tumours. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 8, p. 1117–1126, 1 maio 2004.

RODRIGUEZ-GALINDO, C. et al. Biology, clinical characteristics, and management of adrenocortical tumors in children. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 45, n. 3, p. 265–273, 2005.

RODRIGUEZ-GALINDO, C. et al. Treatment of Pediatric Adrenocortical Carcinoma With Surgery, Retroperitoneal Lymph Node Dissection, and Chemotherapy: The Children's Oncology Group ARAR0332 Protocol. **Journal of Clinical Oncology**. v. 39, n. 22, p. 2463-2473, 2021.

ROSENBLUH, J. et al. β-Catenin-Driven Cancers Require a YAP1 Transcriptional Complex for Survival and Tumorigenesis. **Cell**, v. 151, n. 7, p. 1457–1473, dez. 2012.

SALCEDO ALLENDE, M. T. et al. Overexpression of Yes Associated Protein 1, an Independent Prognostic Marker in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Correlated With Liver Metastasis and Poor Prognosis. **Pancreas**, v. 46, n. 7, p. 913–920, ago. 2017.

SALOMON, A. et al. Loss of β -catenin in adrenocortical cancer cells causes growth inhibition and reversal of epithelial-to-mesenchymal transition. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 11421–11433, 18 mar. 2015.

SANCHEZ-VEGA, F. et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 321- 337.e10, 5 abr. 2018.

SANDRINI, R.; RIBEIRO, R. C.; DELACERDA, L. Childhood Adrenocortical Tumors1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 7, p. 2027–2031, 1 jul. 1997.

SBIERA, I. et al. Epithelial and Mesenchymal Markers in Adrenocortical Tissues: How Mesenchymal Are Adrenocortical Tissues? **Cancers**, v. 13, n. 7, p. 1736, jan. 2021.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.

SILVA, E. et al. The Tumor-Suppressor Gene fat Controls Tissue Growth Upstream of Expanded in the Hippo Signaling Pathway. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2081–2089, 7 nov. 2006.

SONG, S. et al. Hippo Coactivator YAP1 Upregulates SOX9 and Endows Esophageal Cancer Cells with Stem-like Properties. **Cancer Research**, v. 74, n. 15, p. 4170–4182, 1 ago. 2014.

SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 25 out. 2005.

SZULZEWSKY, F. et al. Comparison of tumor-associated YAP1 fusions identifies a recurrent set of functions critical for oncogenesis. **Genes & Development**, v. 34, n. 15–16, p. 1051–1064, 1 ago. 2020.

SZULZEWSKY, F.; HOLLAND, E. C.; VASIOUKHIN, V. YAP1 and its fusion proteins in cancer initiation, progression and therapeutic resistance. **Developmental Biology**, v. 475, p. 205–221, 1 jul. 2021.

TADJINE, M. et al. Frequent mutations of β -catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas^{*}. **Clinical Endocrinology**, v. 68, n. 2, p. 264–270, 2008.

TANAS, M. R. et al. Mechanism of action of a WWTR1(TAZ)-CAMTA1 fusion oncoprotein. **Oncogene**, v. 35, n. 7, p. 929–938, fev. 2016.

TAO, J. et al. Activation of β -Catenin and Yap1 in Human Hepatoblastoma and Induction of Hepatocarcinogenesis in Mice. **Gastroenterology**, v. 147, n. 3, p. 690–701, 1 set. 2014.

TERZOLO, M. et al. Management of adrenal cancer: a 2013 update. Journal of Endocrinological Investigation, v. 37, n. 3, p. 207–217, 1 mar. 2014.

TETSU, O.; MCCORMICK, F. β-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. **Nature**, v. 398, n. 6726, p. 422–426, abr. 1999.

THOMPSON, B. J. YAP/TAZ: Drivers of Tumor Growth, Metastasis, and Resistance to Therapy. **BioEssays**, v. 42, n. 5, p. 1900162, 2020.

TISSIER, F. et al. Mutations of β -Catenin in Adrenocortical Tumors: Activation of the Wnt Signaling Pathway Is a Frequent Event in both Benign and Malignant Adrenocortical Tumors. **Cancer Research**, v. 65, n. 17, p. 7622–7627, 1 set. 2005.

TOULEIMAT, N.; TOST, J. Complete pipeline for Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. **Epigenomics**, v. 4, n. 3, p. 325–341, jun. 2012.

TSUTSUMI, R. et al. YAP and TAZ, Hippo Signaling Targets, Act as a Rheostat for Nuclear SHP2 Function. **Developmental Cell**, v. 26, n. 6, p. 658–665, 30 set. 2013.

VARELAS, X. et al. The Hippo Pathway Regulates Wnt/β-Catenin Signaling. **Developmental Cell**, v. 18, n. 4, p. 579–591, 20 abr. 2010.

WAGNER, J. et al. High Frequency of Germline p53 Mutations in Childhood Adrenocortical Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 22, p. 1707–1710, 16 nov. 1994.

WAJCHENBERG, B. L. et al. Adrenocortical carcinoma. Cancer, v. 88, n. 4, p. 711–736, 2000.

WANG, C. et al. Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3σ sequestering YAP in the cytoplasm. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 1, p. 27–37, 15 dez. 2015.

WANG, L. et al. Overexpression of YAP and TAZ Is an Independent Predictor of Prognosis in Colorectal Cancer and Related to the Proliferation and Metastasis of Colon Cancer Cells. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e65539, 10 jun. 2013.

WANG, Y. et al. β-catenin-mediated YAP signaling promotes human glioma growth. **Journal** of Experimental & Clinical Cancer Research, v. 36, n. 1, p. 136, 29 set. 2017.

WANG, Y. et al. Comprehensive Molecular Characterization of the Hippo Signaling Pathway in Cancer. **Cell Reports**, v. 25, n. 5, p. 1304- 1317.e5, out. 2018.

WASSERMAN, J. D. et al. Prevalence and Functional Consequence of TP53 Mutations in Pediatric Adrenocortical Carcinoma: A Children's Oncology Group Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 6, p. 602–609, 20 fev. 2015.

WEI, C.; LI, X. The Role of Photoactivated and Non-Photoactivated Verteporfin on Tumor. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020.

WEISS, L. M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 8, n. 3, p. 163–170, mar. 1984.

WEST, A. N. et al. Gene Expression Profiling of Childhood Adrenocortical Tumors. **Cancer Research**, v. 67, n. 2, p. 600–608, 15 jan. 2007.

WIENEKE, J. A.; THOMPSON, L. D. R.; HEFFESS, C. S. Adrenal Cortical Neoplasms in the Pediatric Population: A Clinicopathologic and Immunophenotypic Analysis of 83 Patients. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 27, n. 7, p. 867–881, jul. 2003.

WINKLER, J. et al. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5120, 9 out. 2020.

WU, H. et al. Clinicopathological and prognostic significance of Yes-associated protein expression in hepatocellular carcinoma and hepatic cholangiocarcinoma. **Tumor Biology**, v. 37, n. 10, p. 13499–13508, 1 out. 2016.

XING, Y. et al. Development of Adrenal Cortex Zonation. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Adrenal Cortical Neoplasia. v. 44, n. 2, p. 243–274, 1 jun. 2015.

YEUNG, K. T.; YANG, J. Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis. **Molecular Oncology**, v. 11, n. 1, p. 28–39, 2017.

ZANCONATO, F.; CORDENONSI, M.; PICCOLO, S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. **Cancer Cell**, v. 29, n. 6, p. 783–803, jun. 2016.

ZHANG, H. et al. Tumor-selective proteotoxicity of verteporfin inhibits colon cancer progression independently of YAP1. **Sci. Signal.**, v. 8, n. 397, p. ra98–ra98, 6 out. 2015.

ZHANG, X. et al. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, is an ovarian cancer oncogene. **Oncogene**, v. 30, n. 25, p. 2810–2822, jun. 2011.

ZHANG, X. et al. The Hippo pathway oncoprotein YAP promotes melanoma cell invasion and spontaneous metastasis. **Oncogene**, v. 39, n. 30, p. 5267–5281, jul. 2020.

ZHAO, B. et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. **Genes & Development**, v. 21, n. 21, p. 2747–2761, 1 nov. 2007.

ZHAO, B. et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. **Genes & Development**, v. 22, n. 14, p. 1962–1971, 15 jul. 2008.

ZHAO, X. et al. A combinatorial strategy using YAP and pan-RAF inhibitors for treating KRAS-mutant pancreatic cancer. **Cancer Letters**, v. 402, p. 61–70, 28 ago. 2017.

ZHENG, S. et al. Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. **Cancer Cell**, v. 29, n. 5, p. 723–736, maio 2016.

Apêndices

APÊNDICE A

Id. Anônima	Id. RNASe q	Id. Metilaçã o	Gru po Meti laçã o <i>YAP</i> 1	Cen tro de refe rênc ia	S e x o	Id a d e a o di a g n ós ti co (a n os)	A p r e s e n t a ç ã o c lí n i c a	T a m a n h o tu m or al (c m)	Peso tum oral (g)	E s t á d i o t u m o r a l	Di ag nó sti co tu mo ral (es co re)	Qu im iot er api a ad ju va nte	Do en ça re cid iva ou me tás tas e	Te m po de seg ui me nt o (a no s)	Desfech 0	Genótip o germin ativo p53 p.R337 H	Gen ótip o som átic o B- cate nina
							"										
pACT001	ND	20283522005 6_R06C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	8,0	C	9,5	230,0	III	UMP (3)	Sim	Sim	1,3	Óbito	p.R337H	WT
pACT001 pACT003	ND KBRZUSP RA_0127	20283522005 6_R06C01 20283522003 6_R04C01	YAP1-1 YAP1-1	FMRP- USP FMRP- USP	F F	8,0	C A	9,5 2,6	230,0 6,0	III IV	UMP (3) AAC (1)	Sim Sim	Sim Não	1,3 2.8	Óbito Vivo e livre de doença	p.R337H p. R337R	WT WT

Características demográficas, clínicas, tumorais e moleculares individuais dos 69 pacientes pediátricos da coorte FMRP/USP-Boldrini.

pACT009	KBRZUSP RA_0129	20283522005 1_R08C01	YAP1-2	FMRP- USP	F	1,4	V	8,0	151,0	II	UMP (3)	Não	Não	9.6	Vivo e livre de doença	p.R337H	p.S37C
pACT010	KBRZUSP RA_0174	20283522007 3_R06C01	YAP1-2	CIB	F	2,9	V	3,0	11,5	I	AAC (1)	Não	Não	5.4	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT012	ND	20283513009 1_R05C01	YAP1-1	FMRP- USP	М	2,8	V	15,0	828,0	IV	CAC (6)	Sim	Sim	0,5	Óbito	p.R337H	p.S45P
pACT013	KBRZUSP RA_0128	20283522003 6_R02C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	1,6	V	5,5	77,0	Ι	UMP (3)	Não	Não	3,2	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT014	ND	20283522006 5_R07C01	YAP1-2	CIB	F	8,8	V	3,5	21,5	Ι	UMP (3)	Não	Não	6,0	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT017	ND	20283522005 1_R04C01	YAP1-2	FMRP- USP	F	0,4	C,	6,0	60,0	Ι	UMP (3)	Não	Não	22.3	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT020	KBRZUSP RA_0130	20283522005 1_R06C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	3,0	V	13,0	402,0	Π	UMP (3)	Sim	Não	1,7	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT021	KBRZUSP RA_0131	20283513009 1_R07C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	0,4	V	9,0	153,0	Π	ND	Não	Não	13,10	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT023	KBRZUSP RA_0185	ND	ND	CIB	М	3,2	А	17	1070,0	III	CAC (7)	Sim	Não	6,8	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT025	KBRZUSP RA_0165	20283522006 5_R08C01	YAP1-1	CIB	М	16,6	А	16,0	830,0	IV	CAC (7)	Sim	Sim	0,90	Óbito	p.R337H	WT
pACT026	KBRZUSP RA_0132	20283522003 4_R04C01	YAP1-1	FMRP- USP	М	3,8	V	5,2	44,0	Ι	CAC (4)	Sim	Sim	14,20	Vivo com doença ativa	p.R337H	WT
pACT028	KBRZUSP RA_0173	20283522007 3_R05C01	YAP1-2	CIB	F	2,1	V	4,3	70,0	Ι	AAC (1)	Não	Não	1,10	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT029	ND	20283522003 6_R07C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	16,0	С	9,0	347,0	IV	CAC (4)	Sim	Sim	0,80	Óbito	p.R337H	WT
pACT030	KBRZUSP RA_0184	20283522007 5_R07C01	YAP1-1	CIB	М	0,4	v	7,2	110,0	II	UMP (3)	Não	Não	5,20	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT

pACT034	KBRZUSP RA_0172	ND	ND	CIB	F	1,7	A	11,0	228,0	IV	UMP (3)	Sim	Não	12,0	Óbito	p.R337H	wt
pACT035	KBRZUSP RA_0133	20283522005 6_R02C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	6,5	v	4,6	29,0	Π	CAC (5)	Sim	Sim	3,70	Óbito	p.R337H	WT
pACT036	ND	20283522003 4_R07C01	YAP1-1	FMRP- USP	М	1,1	v	7,5	121,0	Π	UMP (3)	Não	Sim	18,20	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT037	KBRZUSP RA_0134	20283522005 1_R05C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	2,8	v	3,0	9,0	Ι	AAC (1)	Não	Não	9,00	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT038	KBRZUSP RA_0135	20283522003 6_R08C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	0,7	A	3,8	9,0	Ι	AAC (2)	Não	Não	3,40	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT040	KBRZUSP RA_0136	20283522003 6_R01C01	YAP1-2	FMRP- USP	F	1,5	v	3,0	19,0	Ι	UMP (3)	Não	Não	4,40	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT044	KBRZUSP RA_0162	ND	ND	CIB	F	1,1	v	4,5	40	Ι	AAC (2)	Não	Não	11,9	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT045	KBRZUSP RA_0138	20283522005 6_R03C01	YAP1-2	FMRP- USP	F	2,0	v	4,2	39,0	Ι	AAC (1)	Não	Não	11,80	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT046	KBRZUSP RA_0139	20283522005 1_R02C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	1,7	v	5,6	41,0	Ι	CAC (4)	Não	Não	6,90	Vivo e livre de doença	p.R337H	p.S45P
pACT048	KBRZUSP RA_0137	20283522005 6_R08C01	YAP1-2	FMRP- USP	М	2,2	v	4,5	10,0	Ι	AAC (1)	Não	Não	0,60	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT049	KBRZUSP RA_0140	20283522003 4_R06C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	9,1	v	3,5	21,0	Ι	AAC (0)	Não	Não	5,20	Vivo e livre de doença	p. R337R	WT
pACT050	ND	20283522005 1_R01C01	YAP1-1	FMRP- USP	М	15,6	C	16,0	703,0	IV	CAC (5)	Sim	Sim	0,70	Óbito	p.R337H	p.S37C
pACT051	KBRZUSP RA_0166	ND	ND	CIB	М	0,8	v	5,0	50,0	Ι	CAC (4)	Não	Não	8,6	Vivo e livre de doença	ND	ND
pACT053	ND	20283522005 1_R07C01	YAP1-2	FMRP- USP	F	3,0	v	4,3	16,0	Ι	UMP (3)	Não	Não	7.10	Perda de seguimento	p.R337H	WT

pACT054	KBRZUSP RA_0181	20283522007 5_R05C01	YAP1-1	CIB	F	1,6	V	7,0	110,0	II	AAC (2)	Não	Não	9,60	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT055	KBRZUSP RA_0141	20283513009 1_R03C01	YAP1-2	FMRP- USP	F	2,0	V	2,6	8,0	Ι	AAC (1)	Não	Não	1,50	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT058	KBRZUSP RA_0142	20283522003 4_R05C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	1,2	V	3,7	32,0	I	CAC (5)	Não	Não	6,70	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT059	KBRZUSP RA_0161	20283522006 5_R04C01	YAP1-2	CIB	М	2,2	V	5,5	30,0	I	AAC (2)	Não	Não	4,40	Vivo e livre de doença	p.R337H	p.G34E
pACT060	ND	20283522003 4_R08C01	YAP1-2	FMRP- USP	F	13,2	А	4,0	154,0	II	AAC (0)	Não	Não	5,10	Vivo e livre de doença	p. R337R	WT
pACT061	KBRZUSP RA_0164	20283522006 5_R06C01	YAP1-1	CIB	М	0,8	А	11,5	390,0	III	ND	Não	Sim	0,70	Vivo com doença ativa	ND	WT
pACT062	KBRZUSP RA_0159	20283522006 5_R03C01	YAP1-2	CIB	F	1,5	А	2,50	NA	Ι	ND	Não	Não	0,80	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT064	KBRZUSP RA_0151	20283522005 6_R01C01	YAP1-1	FMRP- USP	М	6,9	С	9,5	108,0	II	UMP (3)	Sim	Sim	0,6	Óbito	p.R337H	WT
pACT065	KBRZUSP RA_0179	20283522007 5_R03C01	YAP1-2	CIB	F	3,7	v	8,5	250,0	Π	UMP (3)	Não	Não	6,3	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT066	KBRZUSP RA_0186	ND	ND	CIB	F	1,5	v	7,0	ND	Ш	UMP (3)	Sim	Não	9,1	Vivo e livre de doença	p.R337H	ND
pACT067	KBRZUSP RA_0180	20283522007 5_R04C01	YAP1-1	CIB	F	2,3	v	10,0	350,0	II	UMP (3)	Não	Não	4,3	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT068	KBRZUSP RA_0144	20283513009 1_R04C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	1,4	v	3,7	16,0	Ι	AAC (2)	Não	Não	1,40	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT070	KBRZUSP RA_0177	20283522007 5_R01C01	YAP1-2	CIB	М	3,2	v	3,0	40,0	Ι	AAC (1)	Não	Não	7,2	Vivo e livre de doença	p.R337H	ND
pACT073	KBRZUSP RA_0178	20283522007 5_R02C01	YAP1-1	CIB	F	1,4	v	7,0	110,0	Π	AAC (1)	Não	Não	8,8	Vivo e livre de doença	ND	ND

pACT075 KBRZUSP 20283522005	20283522005	YAP1-1	FMRP-	F	0.9	v	3.5	15.0	I AAC	AAC	Não	Não	9.1	Vivo e livre	p.R337H	WT	
F	RA_0143	6_R04C01		USP		.,,	·		,-		(1)			- ,-	de doença	P	
pACT078	KBRZUSP	20283522003	YAP1-1	FMRP-	F	1.5	v	6.5	85.0	ш	ND	Sim	Não	9.0	Vivo e livre	p.R337H	WT
F	RA_0145	4_R02C01		USP		-,-								,.	de doença	P	
pACT079	KBRZUSP	ND	ND	CIB	F	0.7	v	5.7	70.0	ш	ND	Sim	Não	5.7	Vivo e livre	ND	ND
priorory	RA_0158		1.2		-				, 0,0		1.2		1.00	0,7	de doença	1.2	112
pACT081	KBRZUSP	20283522007	YAP1-1	CIB	м	0.7	v	2.0	10.2	I	UMP	Não	Não	5.5	Vivo e livre	p.R337H	WT
pricion	RA_0167	3_R01C01				0,7		2,0	10,2		(3)	1,400	1 tuo	5,5	de doença	p.105711	
nACT083	KBRZUSP	ND	ND	CIB	м	7.2	v	10.7	430.0	ш	CAC	Sim	Não	49	Vivo e livre	n R337H	ND
pricious	RA_0160	nD	ND	СШ	111	7,2		10,7	430,0		(6)	Sim	1400	ч,У	de doença	p.105711	
nACT085	KBRZUSP	20283522005	YAP1-2	FMRP-	F	17	v	6.0	84.0	т	AAC	Não	Não	1.0	Perda de	n R337H	WT
pAC 1005	RA_0152	6_R07C01	1 AI 1-2	USP	1	1,7	•	0,0	04,0	1	(1)	INdo	Ivao	1,0	seguimento	p.ix55711	** 1
nACT086	KBRZUSP	ND	ND	CIB	F	13	Δ	3.8	70.0	т	AAC	Não	Não	11.8	Vivo e livre	n R337H	WT
pAC 1000	RA_0169	59	ND	СШ	1	1,5		5,0	70,0	1	(2)	INdo	Ivao	11,0	de doença	p.ix55711	** 1
nACT087	KBRZUSP	20283513009	VAP1-1	FMRP-	F	15	v	7.0	113.0	ш	CAC	Não	Sim	0.2	Perda de	n R337H	WT
priciou	RA_0155	1_R06C01	1741-1	USP	1	1,5		7,0	115,0		(4)	1140	Sim	0,2	seguimento	p.105711	
nACT088	KBRZUSP	20283522003	VAP1-1	FMRP-	F	2.5	v	16	10.0	т	AAC	Não	Não	0.2	Perda de	n R337H	WT
pAC 1000	RA_0146	6_R06C01	1 АТ 1-1	USP	1	2,5	•	4,0	10,0	1	(1)	INdo	Ivao	0,2	seguimento	p.ix55711	** 1
nACT080	KBRZUSP	ND	ND	CIR	м	0.4	V+	37	20.0	т	AAC	Não	Não	16.8	Vivo e livre	n P337U	WT
pAC 1089	RA_0183	ND ND	ND	СШ	IVI	0,4	C	5,7	20,0	1	(2)	INAU	INdu	10,8	de doença	p.K55711	** 1
nACT090	KBRZUSP	20283522003	VAD1 2	FMRP-	м	1.2	v	53	50.0	т	AAC	Não	Não	13	Vivo e livre	n P337U	WT
pAC1090	RA_0147	6_R03C01	1 AI 1-2	USP	IVI	1,2	, v	5,5	50,0	1	(2)	INAU	INdo	4,5	de doença	p.K55711	** 1
n A CT002	KBRZUSP	20283522003	VAD1 2	FMRP-	Б	2.1	v	15	71.0	т	CAC	Não	Não	20	Vivo e livre	n D227U	WT
pAC1092	RA_0148	6_R05C01	1 AF 1-2	USP	Г	2,1	v	4,5	/1,0	1	(4)	INAO	INdo	2,0	de doença	р.кээ/п	VV I
nACT002	KBRZUSP	20283513009	VAD1 2	FMRP-	Б	12.2	C	7.0	52.0	т	AAC	Não	Não	12.0	Vivo e livre	n D227D	WT
pAC1093	RA_0154	1_R08C01	1 AF 1-2	USP	Г	12,5	C	7,0	55,0	1	(2)	INAO	INdo	12,0	de doença	p. K 557 K	VV I
nACT004	ND	20283522003	VAD1 2	FMRP-	м	0.0	17	37	20.0	т	AAC	Não	Não	127	Vivo e livre	n D227U	n \$27C
PAC 1094	IND .	4_R03C01	1 AP 1-2	USP	1V1	0,8	v	5,1	20,0		(1)	INAO	INAO	12,1	de doença	р.кээ/п	p.55/C

pACT095	KBRZUSP RA_0175	20283522007 3_R07C01	YAP1-1	CIB	F	1,7	v	5,5	60,0	Ι	UMP (3)	Não	Não	3.2	Vivo e livre de doença	p.R337H	ND
pACT096	ND	20283522007 3_R02C01	YAP1-1	CIB	F	9,3	V + C	14,0	520,0	II	CAC (7)	Sim	Sim	0,8	Óbito	p.R337H	WT
pACT097	KBRZUSP RA_0153	20283522003 4_R01C01	YAP1-2	FMRP- USP	F	11,6	A	25,0	2350,0	II	CAC (4)	Sim	Sim	18,0	Vivo com doença ativa	p. R337R	p.S45P
pACT098	KBRZUSP RA_0176	20283522007 3_R08C01	YAP1-2	CIB	F	2,8	v	5,4	48,0	Ι	AAC (0)	Não	Não	6,8	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT101	KBRZUSP RA_0182	20283522007 5_R06C01	YAP1-1	CIB	М	7,6	v	8,0	110,0	III	CAC (5)	Sim	Sim	1,8	Óbito	p.R337H	WT
pACT102	KBRZUSP RA_0163	20283522006 5_R05C01	YAP1-1	CIB	F	1,1	v	5,0	20,0	I	AAC (2)	Não	Não	3,5	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
pACT107	ND	20283522007 3_R04C01	YAP1-1	CIB	М	10,1	v	15,0	1100,0	IV	CAC (6)	Sim	Sim	6,7	Vivo e livre de doença	p.R337H	WT
*pACT110a	KBRZUSP RA_0150	20283522005 1_R03C01	YAP1-2	FMRP- USP	F	1,9	v	1,8	6,0		AAC (2)	Não	Não	7,7	Vivo e livre de doença	p.R337H	ND
*pACT110b	KBRZUSP RA_0149	20283522005 6_R05C01	YAP1-1	FMRP- USP	F	1,9	v	6	57,0		CAC (4)	Não	Não	7,7	Vivo e livre de doença	p.R337H	ND
pACT120	KBRZUSP RA_0170	ND	ND	CIB	F	11,8	v	8,0	200,0		CAC (5)	Sim	Não	5,5	Vivo e livre de doença	p.R337H	ND

Identificação anônima da amostra na coorte.

Identificação da amostra no RNASeq (Illumina)

Identificação da amostra no Metiloma (Illumina)

Cluster de metilação: YAP1-1 e YAP1-2.

Centro de referência: Centro Infantil Boldrini (CIB) e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Sexo: Masculino (M) e feminino (F).

Idade ao diagnóstico: apresentada e manos.

Apresentação clínica: assintomática (A), síndrome de Cushing (C), virilzação (V) e mista com virilização e síndrome de Cushing (V + C).

Tamanho tumoral: maior diâmetro, apresentado em centímetros.

Peso tumoral: apresentado em gramas.

Estádio tumoral: de acordo com o critério do International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry (IPACTR; RIBEIRO et al., 2012).

Diagnóstico tumoral: classificação histopatológica considerando o critério proposto por Wieneke et al. (2003) e o respectivo escore

do tumor. Adenomas (AAC; \leq 2), potencial de malignidade incerto (UMP; = 3) e carcinomas (CAC; \geq 4).

Quimioterapia adjuvante: Não (apenas cirurgia) e Sim (cirurgia e quimioterapia adjuvante).

Doença recidiva ou metastática: Não (ausência de recidiva local ou metástase a distância após ressecção cirúrgica do tumor primário) e Sim (presença de recidiva local ou metástase a

distância após ressecção cirúrgica do tumor primário).

Tempo de seguimento: tempo transcorrido entre o diagnóstico e a última consulta, apresentado em anos.

Desfecho: estado vital e de doença na última consulta (Vivo e livre de doença, Vivo e com doença ativa, Óbito e Perda de seguimento).

Genótipo germinativo p53 p.R337R (nativo) e p.R337H (mutante)

Genótipo somático da B-catenina nativo (wild-type, WT) ou mutante (respectivo resíduo variante).

ND: não disponível.

*tumores bilaterais síncronos.



Métrica para o valor do ponto de corte nas coortes nas quais foram avaliados os dados de expressão do mRNA de *YAP1*.



Determinação do ponto de corte usando o índice de *youden* para determinar o melhor ponto de corte para a expressão do mRNA de *YAP1* nas coortes de pacientes pediátricos (**A**) FMRP/USP-Boldrini e (**B**) COG/GSE76019 e (**C**) coorte de pacientes adultos do TCGA.

Anexos

ANEXO A

Ofício de aprovação de uso de camundongos.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS





CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "Investigação das bases moleculares da tumorigênese adrenocortical e busca por novos alvos terapêutico", registrado com o número **196/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 30 de outubro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 104 camundongos NSG/nude fêmeas pesando 22g oriundos do Laboratório de Estudos Experimentais em Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 30/10/2017 a 22/11/2022.

We certify that the Protocol n° 196/2017, entitled "Investigation of the molecular basis of adrenocortical tumors and search for new therapeutic targets" is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 09/25/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 104 NSG/nude female mice weighing 22g from the Laboratory of Experimental Studies in Animals of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 11/22/2022.

Ribeirão Preto, 30 de outubro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho Presidente da CEUA-FMRP - USP

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil -14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315.3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br

ANEXO B

Ofício de aprovação de biossegurança para o uso de camundongos transgênicos.

Fundação Hernocentro RP

Assistência, ensino e pesquisa a serviço da vida

Ribeirão Preto, 08 de dezembro 2017.

O projeto de pesquisa intitulado "Investigação das bases moleculares da tumorigênese adrenocortical e busca por novos alvos terapêuticos" em nome de Candy Christie Bellido More supervisionado pelo Prof. Dr. Sonir R. Antoninis, colaborador do Hemocentro de Ribeirão Preto, foi avaliado pela Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio) e pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), recebendo o parecer <u>APROVADO</u> e registrado sob número de processo: 297/2017.016-01.

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório anual da

pesquisa.

Ture ma Ploto

Virginia Picanço e Castro Presidente da CIBio Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

ANEXO C

Ofício de aprovação de uso de amostras tumorais de pacientes com tumor

adrenocortical



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 16 de maio de 2013

Oficio nº 1797/2013 CEP/MGV

Processo HCRP nº 5856/2013

Prezada Senhora

O Comitê de Ética em Pesquisa em sua 366^s Reunião Ordinária realizada em 13/05/2013, recebeu a proposta para Criação de um Biorrepositório denominado, "BANCO DE AMOSTRAS TUMORAIS E DNA DE PACIENTES COM DOENÇAS ENDÓCRINAS" e o enquadrou na categoria: APROVADO, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

De acordo com a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011, o prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa, e pode ser autorizado por até dez anos.

Atenciosamente.

Lan as

DR. " MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Com cópia para: **PROF.DR. SONIR ROBERTO RAUBER ANTONINI** Depto. de Puericultura e Pediatria

Ilustrissima Senhora **PROF*. DR*. MARGARET DE CASTRO** Depto. de Clínica Médica

Campus Universitário - Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP Combili de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP FWA-00002733; IR8-00002186 e Registro SISNEPI/CONEP.nº 4 (016) 3602-2228 cep@hop.usp.tr

www.hcrp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Parecer referente à solicitação de criação de Biorrepositório (Processo 5856/2013)

Nome do Biorrepositório: "Banco de amostras tumorais e DNA de pacientes com doenças endócrinas"

Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Margaret de Castro e Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini

Instituição: Departamento de Clínica Médica e Departamento de Puericultura e Pediatria

I - Identificação

Está sendo pleiteado o reconhecimento de um Biorrepositório denominado: "Banco de amostras tumorais e DNA de pacientes com doenças endócrinas", que terá como responsáveis a Profa. Dra. Margaret de Castro e o Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini, vinculados ao Departamento de Clínica Médica e ao Departamento de Puericultura e Pediatria, respectivamente.

O Biorrepositório "Banco de amostras tumorais e DNA de pacientes com doenças endócrinas" tem como objetivo o armazenamento de amostras de tumores endócrinos e de DNA de indivíduos acometidos por doenças endócrinas, além de indivíduos saudáveis considerados como controles para fins de pesquisa e análise científica. Em muitos pacientes a causa da doença ainda é pouco conhecida no presente e novas pesquisas e métodos diagnósticos poderão ser importantes no futuro.

Tal armazenamento será realizado no Laboratório de Endocrinologia Molecular do HCFMRP – USP em freezer a -20°C (DNA) ou a -70°C (tumores) em frascos identificados por números catalogados no recebimento da amostra. Fica sob a responsabilidade do médico e/ou pesquisador envolvido na pesquisa vigente e sob a responsabilidade geral da Profa. Dra. Margaret de Castro e o Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini a coleta, o armazenamento, a catalogação, a sistematização, a guarda e o uso do material estocado.

Campus Universitário – Monte Alegre 14048-900 Ribeitão Preto SP

Comită de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4 (016) 3402-2228 cep@horp.usp.br

www.hcm.usn.hr


HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



II – Comentários frente às Resoluções 196/1996 e 441/2011 do Conselho Nacional de Saúde

Constam da solicitação:

- O nome do biorrepositório e os responsáveis;
- O tipo de material que será armazenado;
- Anuência do Departamento responsável;
- O compromisso de identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o sigilo e a confidencialidade dos doadores;
- O compromisso de que todo novo projeto proposto com utilização do material estocado será submetido ao CEP;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico.

IV - Parecer

Diante do exposto e a luz das Resoluções CNS 196/96 e 441/2011, meu parecer é que o biorrepositório denominado "Banco de amostras tumorais e DNA de pacientes com doenças endócrinas", que terá como responsáveis a Profa. Dra. Margaret de Castro e o Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini, deve ser enquadrado na categoria "APROVADO", bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico.

Campus Universit\u00e1rio - Monte Alegre 14048-900 Ribeir\u00e1o Preto SP Comité de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4 (016) 3602-2228 oep@hcrp.usp.tv;

www.hcrp.usp.br