

**Universidade de São Paulo**  
**Instituto de Biociências**  
**Departamento de Genética e Biologia Evolutiva**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Estudo da regulação de OCT4 pelo efetor final da via Hippo, YAP, e seu  
efeito sobre células-tronco tumorais de meduloblastoma.**

***Study of the regulation of OCT4 by Hippo Pathway's final effector, YAP,  
and its effect on medulloblastoma tumour stem-cells.***

**LUCAS CARVALHO PRICE**

**São Paulo**

**2023**

**LUCAS CARVALHO PRICE**

**Estudo da regulação de OCT4 pelo efector final da via Hippo, YAP, e seu  
efeito sobre células-tronco tumorais de meduloblastoma.**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Mestre em Ciências  
na área de Biologia Genética.

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto  
Co-orientadora: Dra. Beatriz de Araujo Cortez

**São Paulo**

**2023**

## Ficha Catalografica e Comissão Julgadora

Lucas, Price

Estudo da regulação de OCT4 pelo efetor final da via Hippo, YAP, e seu efeito sobre células-tronco de meduloblastoma / Lucas Price ; orientador Oswaldo Keith Okamoto ; coorientadora Beatriz de Araújo Cortez -- São Paulo, 2023.

89 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Ciências Biológicas (Biologia Genética).

1. Meduloblastoma. 2. Células-tronco Tumorais. 3. Via Hippo. 4. OCT4. 5. YAP. I. Keith Okamoto, Oswaldo, orient. II. de Araújo Cortez, Beatriz, coorient. Título.

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a) Oswaldo Keith Okamoto

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Peter e Ana, que me estimulam a estudar e me interessar pelo mundo desde quando consigo me lembrar. Obrigado por me apoiarem incondicionalmente, e mesmo com todas as dificuldades me incentivarem a continuar seguindo aquilo que eu gosto. Vocês são os melhores pais que eu poderia ter, e devo todas as minhas conquistas a vocês!

A minha namorada Bruna, por ser minha companheira em tudo, pelo carinho e amor, e por sempre me ajudar a seguir em frente mesmo quando tudo parece impossível. Seja no trabalho ou na vida, agradeço por estar comigo em todos os momentos, e deixar todos os meus dias mais leves. Nós passamos por muito nesse último ano, e estou muito feliz de todo esse companheirismo ter se mantido.

À minha tia Márcia e vó Emília pelo carinho e apoio em todos os momentos.

À Delzi, Joel, Carol e Lucas, por todo o suporte e carinho pelos últimos quase 5 anos!

Aos meus amigos da biologia, em especial Bunni, Ritmo, Passo, Appa, Azula, Sharpey, Victor, Catuaba e Brasa por todos os momentos de descontração e diversão.

Às minhas amigas Anna e Luísa, por todo o carinho e por manterem minha saúde mental em dia, me ajudando a me reencontrar sempre que estava perdido. Seja com joguinhos, escaladas, brincadeiras, boas conversas ou passeios deliciosos, vocês deixam qualquer dia mais brilhante.

Ao Kvothe e Anarkia por todas as brincadeiras, risadas e correria!

À Zelda, Sherlock e Jelly, meus irmãos felinos que proporcionam dias muito mais gostosos.

Aos Mind-Feios, Ruy, Gomes e Isa, pelos longos dias nos aventurando por Waterdeep, pelos jogos e queimadas. Mesmo com toda a correria eu podia sempre contar com um bom dia de risadas e descontração.

Aos meus amigos do colégio, em especial Gil, Toledo, Gabriel, Marina, Regis e Lucas, por mesmo depois de quase 11 anos de formados, ainda posso contar com a parceria e amizade.

À Elisa, que apesar de ter conhecido apenas no último ano, se mostrou ser a pessoa mais companheira, me ajudando em absolutamente tudo, estimulando minhas ideias, sugerindo caminhos metodológicos e dando todo o apoio que eu precisava. Posso dizer que com certeza sem você este trabalho não seria uma fração do que ele é agora, e você pode contar comigo para tudo que sempre precisar!

Ao Strogo, meu companheiro de laboratório desde a iniciação científica, com quem aprendi junto sobre a vida de cientista, pelas discussões e ajudas em tudo que eu precisava para desenvolver o meu projeto. Muito obrigado por tudo!

À Patrícia Semedo, por ser uma fonte de conhecimento, e sempre ter dicas valiosas para qualquer dúvida que eu pudesse ter.

A todos do laboratório que tive o prazer de passar meus dias e que com certeza de uma forma ou de outra contribuíram para esse projeto. Obrigado em especial para Alice, Isa, Paula, Vitória e Rodolfo pela ajuda no malabarismo de experimentos, e também Amanda, Gabi, Thaís, Gustavo, Gabriel, Susana, Letícia e Lanae.

Ao meu orientador Keith, com quem estudo há quase 7 anos, e minha

coorientadora Beatriz, que me deslumbraram pelo estudo da Via Hippo na minha iniciação científica, me mostrando uma linha de pesquisa que me cativou e me motivou a seguir até aqui estudando. Obrigado pela paciência, sei que fico muito focado na parte prática e nos experimentos, e não sou o melhor em lembrar das coisas no prazo, mas vocês me estimulam a melhorar constantemente e agradeço muito por terem me iniciado na carreira de cientista.

À Gabi Hsia por me salvar em diversos momentos com reagentes, e me ajudando com novas metodologias, você foi instrumental para o sucesso final desse trabalho, e eu agradeço muito!

Aos alunos dos demais laboratórios do CEPID e do departamento que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento desse projeto.

Aos funcionários da CPG do IB-USP por todas as vezes que precisei de alguma ajuda, vocês sempre conseguiram resolver.

A todos os funcionários do IB/USP, por todo auxílio oferecido.

À agência de fomento, CNPq, processo 133728/2018-8 sem a qual realização desse projeto não seria possível.

## Sumário

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1. CÂNCER</b> .....	12
<b>1.2. MEDULOBLASTOMA</b> .....	17
<b>1.2.1 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO MEDULOBLASTOMA</b> .....	19
<b>1.3. VIA DE SINALIZAÇÃO HIPPO</b> .....	21
<b>1.4. FATOR DE TRANSCRIÇÃO OCT4</b> .....	25
<b>1.5. CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS</b> .....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS GERAIS</b> .....	32
<b>2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	33
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
<b>3.1. CULTURA DE CÉLULAS</b> .....	34
<b>3.2. FORMAÇÃO DE ESFERAS TUMORAIS</b> .....	35
<b>3.3. TRATAMENTO COM RNA DE INTERFERÊNCIA PARA O SILENCIAMENTO DE OCT4</b> .....	35
<b>3.4. EXTRAÇÃO DE RNA</b> .....	37
<b>3.5. SÍNTESE DE CDNA</b> .....	38
<b>3.6. PCR EM TEMPO REAL</b> .....	38
<b>3.7. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA E QUANTIFICAÇÃO POR BCA</b> .....	40
<b>3.8. ANÁLISE POR WESTERN BLOT</b> .....	41
<b>3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	42

<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
<b>4.1. VALIDAÇÃO DO MODELO CELULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE OCT4 EM CÉLULAS DE MEDULOBLASTOMA COM <i>KNOCK-OUT</i> PARA YAP</b> .....	44
<b>4.2. EFEITOS GENÉTICOS DO SILENCIAMENTO TRANSITÓRIO DE OCT4 EM CÉLULAS DE MEDULOBLASTOMA COM CRISPR DE YAP</b> .....	50
<b>4.3. EFEITOS FUNCIONAIS DO SILENCIAMENTO TRANSITÓRIO DE OCT4 EM CÉLULAS DE MEDULOBLASTOMA COM CRISPR PARA YAP</b> .....	58
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	73
<b>5.1. VIA HIPPO E YAP NO ESTUDO DE CÂNCER</b> .....	73
<b>5.2. UMA POSSÍVEL REGULAÇÃO ENTRE OCT4 E YAP EM CÉLULAS TUMORAIS</b> .....	75
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	82
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	83



## Lista de Abreviaturas

ATCC - American Type Culture Collection

Birc5 – inibidor baculoviral da repetição de apoptose contendo 5, comumente chamada de Survivina, do inglês Survivin

BSA - Albumina Sérica Bovina, do inglês Bovine Serum Albumin

cDNA - DNA Complementar, do inglês Complementary DNA

CTGF – Fator de crescimento do tecido conjuntivo, do inglês, connective tissue growth factor

Cyr61 - Indutor angiogênico rico em cisteína 61, do inglês Cysteine-rich angiogenic inducer 61

Daoy YAP-KO – Clone de Daoy com inibição de YAP por CRISPR

Daoy YAP-KO+TAZ-KD - Clone de Daoy com inibição de YAP e redução na expressão de TAZ por CRISPR

DEPC - Dicarbonato de Dietila, do inglês Diethylpyrocarbonate

DMEM - Do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM/F12 DMEM - suplementado com F12

EGF - Fator de Crescimento Epidermal, do inglês Epidermal Growth Factor

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblasto, do inglês Fibroblast Growth Fator

IB/USP - Instituto de Biociências da

INCA - Instituto Nacional de Câncer

iPSCs - Células-Tronco Pluripotente Induzidas, do inglês Induced Pluripotent Stem-Cells

KD – Silenciamento gênico, do inglês knockdown

KO – Nocaute gênico do inglês, knockout

MB - Meduloblastoma

MEM - Do inglês Minimum Essential Medium

OCT4 – Octamer binding transcription factor 4

OMS - Organização mundial da Saúde

PBS - Solução Tampão Fosfato-Salino, do inglês Phosphate-buffered saline

qRT-PCR - PCR em Tempo Real

SFB - Soro Fetal Bovino

SHH - Via de Sinalização Sonic-Hedgehog

siRNA – pequeno RNA de interferência, do inglês small interfering RNA

SNC - Sistema Nervoso Central

TBST – Tampão, do inglês Tris-Buffered Saline and Tween 20

TE - Tris-EDTA

USP13-Med YAP-KO<sup>A</sup> - Clone de USP13-Med com inibição de YAP por CRISPR

USP13-Med YAP-KO<sup>B</sup> – Outro clone de USP13-Med com inibição de YAP por  
CRISPR

WNT – Via de sinalização da wnt

YAP – Yes-Associated Protein 1

## Resumo

A proteína OCT4 já vem sendo estudada devido à sua importância na manutenção de pluripotência e autorrenovação em células-tronco. Ela é um dos quatro Fatores de Yamanaka, utilizados na formação de células pluripotentes induzidas (iPSCs). Além disso, a expressão anormal de OCT4 é encontrada em tumores e sua expressão exacerbada mostrou-se relacionada a um pior prognóstico em pacientes com diferentes tipos de câncer. Diferentes grupos mostraram que esta proteína pode ser regulada por um outro fator de transcrição, o efetor final da Via Hippo, o YAP, responsável por regular a expressão de diversos genes associados com proliferação e sobrevivência celular e cuja expressão também está relacionada com os fenótipos de células-tronco normais e tumorais. No presente estudo é avaliada a importância da expressão de YAP para a atividade de OCT4 em linhagens de meduloblastoma, um tumor caracterizado por apresentar células-tronco tumorais em sua composição. Isto foi feito com células *knock-out* para YAP, nas quais analisamos da expressão de OCT4 e os genes-alvo de YAP; *Birc5*, *Cyr61* e *CTGF*. A seguir, investigamos se a expressão de OCT4 é impreterível para os efeitos da desregulação da Via Hippo por meio de ensaios de capacidade de formação de esferas tumorais comparando as linhagens com inibição de OCT4 por RNA de interferência. Nós observamos que com a inibição de YAP, houve uma redução significativa na expressão proteica, e não gênica, de OCT4, e que as esferas tumorais geradas com silenciamento de OCT4 apresentaram uma menor capacidade proliferativa, de coesão e de autorrenovação nas duas linhagens estudadas, similarmente ao que ocorre com a inibição isolada de YAP. Esses achados dão alguns indícios de uma regulação entre YAP e OCT4 que deve ser explorada mais a fundo.

**Palavras-Chave:** OCT4, YAP, Meduloblastoma, Células-tronco tumorais, Via Hippo.

## Abstract

The protein OCT4 is already being studied due to its importance in the maintenance of pluripotency and self-renewal in stem cells. It is one of the four Yamanaka Factors, utilized in the formation of induced pluripotent stem cells (iPSCs). Besides this, the abnormal expression of OCT4 is to be found in tumours and its exacerbated expression has been shown to be related to a worse prognosis in patients with different types of cancer. Different groups have shown that this protein may be regulated by another transcription factor, the final effector of the Hippo Pathway, YAP, that is responsible for regulating the expression of various genes associated with cellular proliferation and survival and the expression of which is also related to the phenotypes of normal and cancer stem cells. In the present study, we evaluate the importance of YAP expression to the activity of OCT4 in medulloblastoma cell-lines, a tumour characterized by the presence of cancer stem cells in its composition. This was done with YAP *knock-out* cells, where we analyzed the expression of OCT4, and the target genes of YAP; *Birc5*, *Cyr61* and *CTGF*. We then investigated whether or not the expression of OCT4 is imperative to the effects seen with the deregulation of the Hippo Pathway, through tumorsphere formation assays, comparing the cell lines with OCT4 inhibition by small interference RNA. We observed that with the inhibition of YAP, there was a significant reduction in protein expression, but not gene expression, of OCT4, and that the tumorspheres generated while silencing OCT4 showed lower proliferative capacity, cohesion and self-renewal as compared to control, similarly to what occurred with the isolated inhibition of YAP. These findings give some indications of a regulation between YAP and OCT4 that should be explored more deeply.

**Key Words:** OCT4, YAP, Medulloblastoma, Cancer Stem Cells, Hippo Pathway.

## 1. Introdução

### 1.1. Câncer

O câncer é uma das doenças mais mortais do mundo, representando a segunda maior causa de morte, atrás apenas de doenças cardiovasculares (OMS, 2020). De acordo com dados obtidos e publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), houve cerca de 19,3 milhões de novos casos e foram reportados quase 10 milhões de mortes no mundo decorrentes de complicações associadas ao câncer em 2020. Ainda, sabe-se que o número de novos casos de câncer vem aumentando gradativamente ao longo dos anos (já que foram reportados 14,1 milhões e 18,1 milhões de casos nos anos de 2012 e 2018, respectivamente), evidenciando o câncer como um importante problema de saúde pública mundial (OMS, 2020). No Brasil, o número de novos casos de neoplasias em 2020 foi de 592.212, e 259.949 mortes por câncer. Em 2016, neoplasias representavam 18% das causas de mortes gerais no Brasil, sendo o segundo lugar atrás apenas de doenças cardiovasculares (28%) (OMS, 2018).

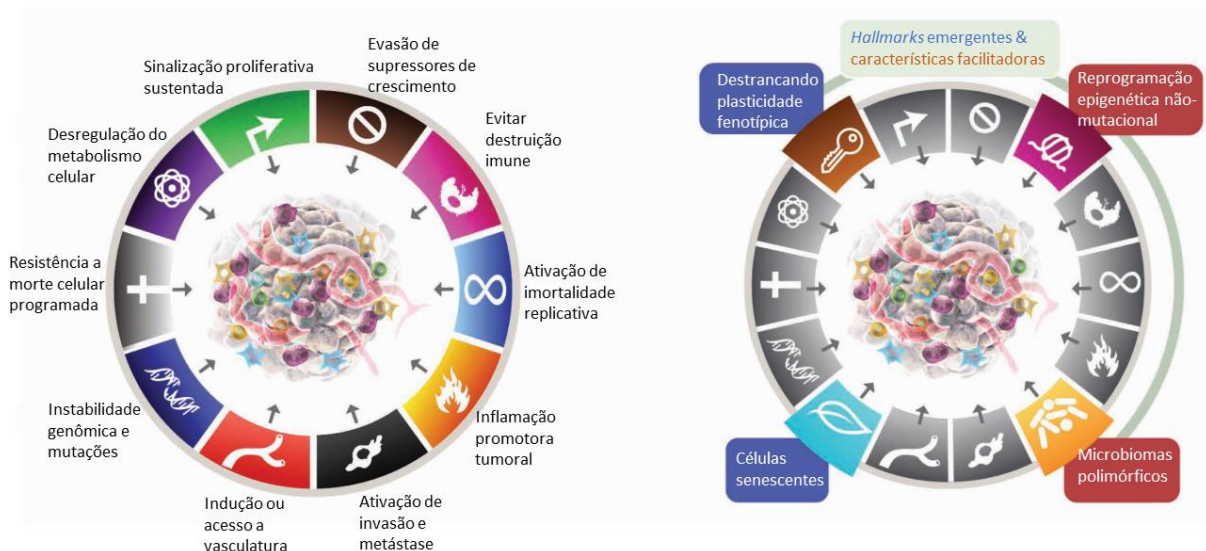
Um trabalho muito importante na área do câncer que vem sendo desenvolvido a quase duas décadas é o *Hallmarks of Cancer*, por Hanahan e Weinberg, que tem como objetivo compilar as novas descobertas no campo, e desenvolver os chamados hallmarks, que são características adquiridas por células tumorais no processo de atingirem o fenótipo maligno e que são comuns ao desenvolvimento de todos os tipos de tumores (Hanahan e Weinberg, 2000, 2011, Hanahan 2022), e que podem auxiliar no entendimento de como essa doença surge, evolui, e como podemos usar essas informações para tentar desenvolver melhores tratamentos e direcionar pesquisas para que novas descobertas sejam feitas. Inicialmente eram 6 *hallmarks*; (1) resistência à morte celular, (2) angiogênese, (3) imortalidade replicativa, (4) ativação

de invasão e metástase, (5) evasão de supressores proliferativos e (6) manutenção do sinal proliferativo (Hanahan e Weinberg, 2000).

Depois de 11 anos, o par publicou uma continuação para esse trabalho, apresentando dois novos “*hallmarks* emergentes” e duas características que funcionariam como “facilitadoras”, deixando de tratar o tumor como apenas células proliferativas isoladas, mas como tecidos complexos compostos de diversos tipos celulares e microambientes que estão ativamente contribuindo para o desenvolvimento tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011). Os “*hallmarks* emergentes” são: (1) a capacidade de desregulação energética das células tumorais, de forma a conseguir suprir a constante demanda energética de uma proliferação desenfreada, e (2) a evasão ativa do ataque e destruição por células imunes, esta que denota a dicotomia do sistema imune durante o desenvolvimento tumoral que está agindo tanto como um antagonista quanto um auxiliador de sua progressão. Enquanto isso, as duas características facilitadoras são: (1) o aumento da instabilidade genômica de células tumorais em decorrência da proliferação desenfreada e evasão de morte celular, com menor efetividade da maquinaria responsável por impedir a divisão anormal dessas células, e (2) a inflamação que ocorre em lesões pré-malignas e malignas que pode promover a progressão tumoral por diversas vias diferentes (Hanahan e Weinber, 2011). A primeira característica facilitadora é especialmente importante para o presente trabalho, pois estamos estudando uma desregulação genética que ocorre em diversos tipos de tumores que leva a uma maior proliferação celular e conseqüente maior instabilidade dessas células que podem adquirir novas características que contribuem para uma maior agressividade tumoral e pior prognóstico para os pacientes.

Por fim, em 2022, Hanahan publicou uma continuação dessa pesquisa, na qual expressa que depois dos 11 anos de pesquisa essas quatro características apresentadas podem ser solidificadas como dois novos *hallmarks*, e duas características facilitadoras, e propõe quatro novos “*hallmarks* emergentes”: (1) o desbloqueio de plasticidade fenotípica, fazendo menção às diversas formas que as células tumorais podem se transformar contribuindo para a diversidade de tipos celulares formando o tumor, seja por desdiferenciação, transdiferenciação ou “bloqueio de diferenciação”, que é a manutenção da célula em um estado parcialmente progenitor, e parcialmente diferenciado que pode também tornar-se dormente, com potencial de reiniciar a expansão proliferativa. (2) Reprogramação epigenética não-mutacional, que pode ocorrer por mudanças no microambiente tumoral que levam a mudanças amplas no epigenoma, ou pela própria heterogeneidade da regulação epigenética em diferentes tipos celulares. (3) Microbiomas polimórficos, que são as diferentes populações de microbiota que se associam simbioticamente com diferentes tecidos do corpo, como a epiderme e a mucosa interna, em particular do trato gastrointestinal, pulmão e mama. Estas populações podem ter efeitos benéficos ou deletérios para o desenvolvimento tumoral, progressão maligna e resposta a terapias (Dzutsev *et al.*, 2017, Helmink *et al.*, 2019, Deshmukh, 2020). Por fim, (4) células senescentes aparecem como possíveis facilitadoras do desenvolvimento tumoral, principalmente pelo mecanismo de secreção mediada por senescência, que é responsável pela liberação de diversas proteínas bioativas, como citocinas e proteases que podem estimular o desenvolvimento tumoral e a progressão maligna (Kowald *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2020), além da reintrodução ao ciclo celular de células senescentes por reprogramação tronco (Lee e Schmitt, 2019, Hanahan, 2022). Toda a discussão levantada por esse trabalho contínuo ilustra a complexidade

tumoral e os caminhos que podem ser explorados no desenvolvimento de pesquisas para melhor entender essa doença. Na Figura 1 estão ilustrados os *hallmarks* originais (Hanahan e Weinberg, 2011), e as 4 novas adições do ano passado (Hanahan, 2022).



**Figura 1. Hallmarks (características) de células tumorais que passam pelo processo de adquirir um fenótipo maligno.** Esquerda, características originais propostas em 2011 por Hanahan e Weinberg compostas por oito características centrais e duas facilitadoras. Direita, quatro novas características propostas no trabalho mais recente de Hanahan. Traduzido e adaptado de Hanahan, 2022.

A complexidade biológica do câncer está diretamente relacionada com a alta mortalidade desta doença. O desenvolvimento do câncer é influenciado pela combinação de fatores de risco genéticos e ambientais, como: idade, sexo, etnia, estilo de vida e variantes genéticas de susceptibilidade. Na maior parte dos casos o desenvolvimento dessa doença heterogênea se dá pela combinação destes diferentes fatores, dificultando o desenvolvimento de medidas de prevenção e tratamentos eficazes contra todos os tipos tumorais. Os tumores com maior



mortalidade na população mundial em 2020 foram os de pulmão, fígado e colorretal, os três representando pouco mais de 30% de todos os casos da doença no mundo (GLOBOCAN 2020). No caso do Brasil, os tipos tumorais mais comuns são os de próstata e o de mama (16,4% e 14,9%, respectivamente) (OMS, 2020).

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) compreendem cerca de 1,8% de todos os tumores malignos no mundo, sendo que 88% dos casos são no cérebro (INCA, 2022). No Brasil, são estimados 11.490 novos casos em 2022, representando 5% das novas neoplasias ocorridas no país (INCA, 2022). No caso de tumores embrionários do SNC, que acometem principalmente crianças de até 4 anos de idade e jovens adolescentes, a maior parte dos casos são tumores malignos (OSTROM *et al.*, 2020). Dentre os tumores embrionários, o mais comum é o meduloblastoma, um tumor que se desenvolve a partir do cerebelo e que representa 65,8% de todos os tumores embrionários em crianças e adolescentes de 0 a 19 anos de idade.

## **1.2. Meduloblastoma**

O meduloblastoma (MB) foi inicialmente identificado por Bailey e Cushing em 1925 em um experimento envolvendo diferentes corantes químicos na tentativa de auxiliar na identificação e classificação de tumores cerebrais (Bailey e Cushing, 1925). É o tumor cerebral mais comum em crianças até os quatro anos de idade e a causa mais comum de mortes pediátricas em decorrência de câncer (Leto *et al.*, 2016, ABTA, 2022). Ele se desenvolve no cerebelo em decorrência da desregulação de vias de sinalização celulares que atuam durante o desenvolvimento do SNC (Leto *et al.*, 2016). Ele é caracterizado pela OMS como um tumor de grau 4, apresentando células pouco diferenciadas, altamente proliferativas e com capacidade de se espalhar por todo o eixo cérebro-espinhal. Em grande parte, a sua alta agressividade é devida a

facilidade das células tumorais se disseminarem pelo líquido cefalorraquidiano, causando metástases no neuro-eixo em cerca de 40% dos casos diagnosticados (Lee *et al.*, 2022). Podem ocorrer metástases fora do SNC também, que são frequentemente letais, mas muito raras, ocorrendo apenas em cerca de 1-5% dos pacientes (Muio *et al.*, 2011; Kondoff *et al.*, 2015).

Os sintomas mais comuns dos pacientes com meduloblastoma são mudanças no apetite, e sensação de maior pressão no cérebro, como por exemplo dores de cabeça, náusea, vômitos, tontura e problemas de coordenação. Além disso, outros sintomas que podem ocorrer também são fadiga, irritabilidade e outras mudanças comportamentais (ABTA, 2022). O tratamento padrão ouro consiste na remoção cirúrgica máxima do tumor, seguida de radioterapia e quimioterapia (principalmente cisplatina, vincristina, lomustina e ciclofosfamida) para crianças acima de 3-4 anos, devido aos riscos que a terapia de radiação oferece para o cérebro em desenvolvimento. Porém, mesmo com o uso de formas agressivas de tratamento, o meduloblastoma continua sendo uma doença incurável, onde os pacientes apresentam uma sobrevida média de aproximadamente 30 anos (considerando todos os subtipos). Ainda, os pacientes que sobrevivem à doença e aos tratamentos podem apresentar diversas sequelas neurológicas, incluindo transtornos convulsivos e ototoxicidade ou precisarem de um procedimento para drenagem de fluido cérebro-espinal dos ventrículos, chamado de derivação ventrículo-peritonal (Fouladi *et al.*, 2005)

Em seu trabalho, Fouladi e colaboradores analisaram os efeitos de algumas terapias mais agressivas (radioterapia, radioterapia local, irradiação crânio-espinal e quimioterapia com uma combinação de drogas como ciclofosfamida, vincristina, etoposida e compostos de platina) em pacientes com tumores do SNC de até 3 anos

de idade, e relataram que existe um impacto na qualidade de vida dessas pessoas (Fouladi *et al.*, 2005). De fato, em um grupo de 16 pacientes vivos depois de 10 anos de tratamento, apenas um deles não precisou de educação especial, apenas um trabalhava independentemente, e nenhum se casou (Fouladi *et al.*, 2005; Kiltie *et al.*, 1997). Essa proporção foi bem maior do que para pacientes de ependimoma, outro tumor do SNC, dos quais 71% não necessitam de educação especial, em comparação com 20% para pacientes de meduloblastoma (Hoppe-Hirsch *et al.*, 1995). Em 2004, Zebrack e colaboradores avaliaram 1.101 sobreviventes de tumores pediátricos diagnosticados até 18 anos de idade, e reportaram que 74% deles estavam empregados, 63% graduaram o ensino médio e 74% não se casaram (Zebrack *et al.*, 2004), mostrando que pacientes de meduloblastoma apresentam consequências mais severas em relação à média dos pacientes de tumores do SNC. Sem dúvidas, utilizar terapias mais brandas em pacientes com tumores muito agressivos como o meduloblastoma aumentam a chance de recidiva tumoral, diminuindo drasticamente a sobrevida desses pacientes. Deveras, os principais fatores que dificultam a resposta ao tratamento e o desenvolvimento de novas terapias para combater o meduloblastoma são o alto grau de heterogeneidade celular e molecular (Silva *et al.*, 2017; Louis *et al.*, 2007).

### **1.2.1. Classificação molecular do meduloblastoma**

Originalmente, o meduloblastoma era dividido em 4 subgrupos moleculares: Grupo WNT, Grupo SHH, Grupo 3 e Grupo 4 (Northcott *et al.*, 2011), que possuem diferentes prognósticos, taxas de metástase e se desenvolvem diferentemente. Dentro dessa classificação, o subtipo WNT é o mais frequente e o subtipo Grupo 4 é o mais mortal.

Um estudo mais recente sugere a divisão do meduloblastoma em sete subgrupos moleculares primários da doença (Schwalbe *et al*, 2017), ilustrados na Figura 2, com as respectivas taxas de incidência e sobrevivência. Esse tipo de caracterização reforça a complexidade do câncer: são sete mecanismos distintos para diferentes desenvolvimentos da mesma doença, com uma variedade de possíveis genes-alvo envolvidos. Isso ilustra também a importância do avanço das pesquisas científicas nesta área para maior rapidez de diagnóstico, melhor tratamento de pacientes, com diferentes alvos terapêuticos e melhoria de prognósticos.

	WNT	MB <sub>SHH-Child</sub>	MB <sub>SHH-Infant</sub>	MB <sub>Grp4-HR</sub>	MB <sub>Grp4-LR</sub>	MB <sub>Grp3-LR</sub>	MB <sub>Grp3-HR</sub>	
Demographics	Infant disease % (<3 years)	0	5	78	5	3	54	17
	Male %	48	63	55	67	66	68	77
	n	33	38	65	85	73	50	65
Clinical features	Histology (%) CLAS:DN:LCA	86:3:10	32:26:41	35:55:10	86:5:9	85:6:9	90:2:8	61:4:35
	Metastasis (%)	3	16	28	30	23	41	33
	Sub-total resection (%)	10	17	26	35	28	24	25
	10 year overall survival (95% CI)	72% (66-100)	48% (29-80)	58% (46-75)	36% (22-59)	72% (59-88)	69% (55-87)	22% (10-46)
Mutation	CTNNB1, TP53	TP53, TP53 GL, TERT, SUFU, PTCH1	SUFU, PTCH1				GFI1	
Molecular features	Cytogenetics							
	Gene expression*		↑RUNX3, HCAR1, HCAR2, FOXG1	↑TRABD2A, TTC9, SLFN11, CHRM2	↑ESYT2, WDR60, DAPK2, PRDM6	↑BMP5, SPTLC3, COL9A3, ZIC5	↑FGD6, BRMS1L, FAM122B, REV3L	↑PVT1, TRAP1, NMRAL1, CNTLN Ribosome biogenesis genes
DNA methylation	Global	↓ vs CB	↓ vs CB ↑ vs MB <sub>SHH-Infant</sub>	↓ vs CB ↓ vs MB <sub>SHH-Child</sub>	↓ vs CB ↓ vs MB <sub>Grp4-LR</sub>	↓ vs CB ↑ vs MB <sub>Grp4-HR</sub>	↓ vs CB ↑ vs MB <sub>Grp3-HR</sub>	↓ vs CB ↓ vs MB <sub>Grp3-LR</sub>
	Probe level*	PI3K-Akt, Ras signalling pathways	Ras signalling pathway	Hippo signalling pathway	PI3K-Akt signalling pathway			PI3K-Akt signalling pathway
Gene level*		↑ vs MB <sub>SHH-Infant</sub> , CB DLX6-AS1, ACTA1, GCM2, FEZF2				↑ vs MB <sub>Grp4-HR</sub> , CB HLA-DRB5, NXK2-5, ABLIM1, HOXC6	↑ vs MB <sub>Grp3-HR</sub> , CB PRKCZ, MCF2L, MIR662	↑ vs MB <sub>Grp3-LR</sub> , CB GALNT9, MIR662

**Figura 2. Subtipos de Meduloblastoma.** Esquema representando os 7 subgrupos de meduloblastoma sugeridos por Schwalbe e colaboradores mostrando diferentes dados como incidência populacional, fatores clínicos, aspectos moleculares, e vias conhecidas associadas aos diferentes subgrupos - Adaptado de Schwalbe *et al.* (2017).

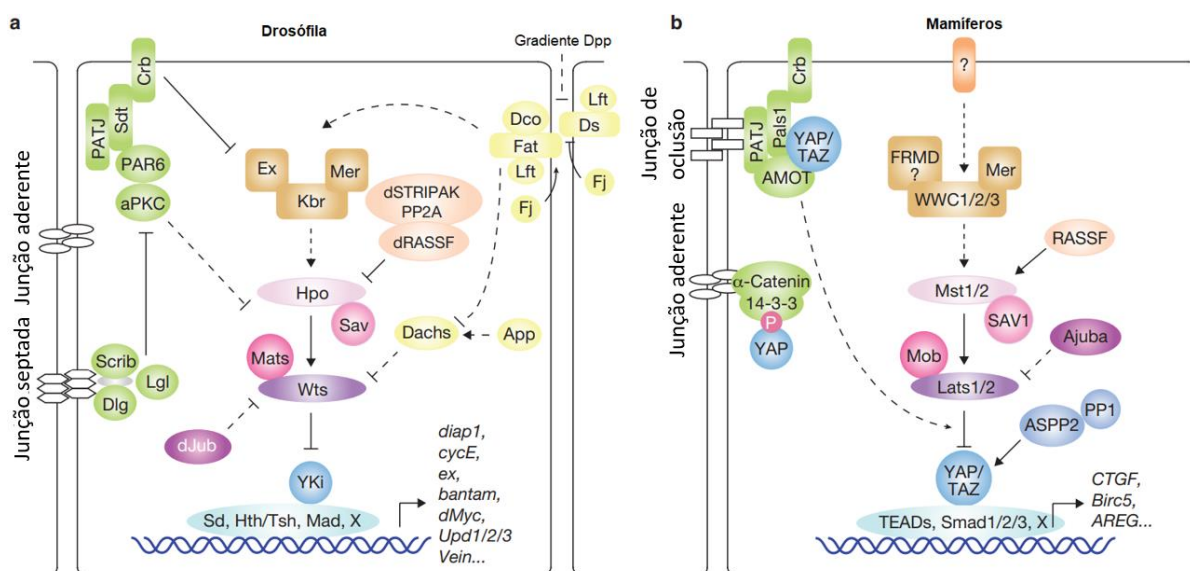
Podemos observar que os pacientes que apresentam meduloblastoma associado ao grupo WNT são os pacientes com melhor prognóstico (cerca de 72%

de taxa de sobrevivência), menor risco de metástase (apenas 3%) e correspondem a cerca de 10% de todos os casos de meduloblastoma (Schwalbe *et al.*, 2017). Aqueles pertencentes ao grupo Sonic Hedgehog (SHH) compreendem cerca de 30% dos casos de meduloblastoma, e são divididos em dois subgrupos baseados em idade, sendo o SHH-*infant* composto crianças até 4 anos e o SHH-*child* maiores de 4 anos de idade. Estes pacientes apresentam um prognóstico médio, oscilando entre 46-58% de taxa de sobrevivência após 10 anos. Ambos os subgrupos 3 e 4 foram divididos em “Alto risco” e “Baixo risco”, e são os subgrupos com maior diversidade molecular de causas para seu desenvolvimento, principalmente o Grupo 3, com amplificação de MYC, e alta instabilidade genômica, que pode ser observada na figura ilustrando as perdas e ganhos cromossômicos. Os pacientes de alto risco apresentam uma taxa de sobrevivência significativamente menor (36% para o Grupo 4 e 22% para o Grupo 3) do que aqueles com baixo risco, que apresentaram taxas de sobrevivência similares às do grupo WNT, em torno de 69-72% (Schwalbe *et al.*, 2017).

Neste mesmo trabalho, Schwalbe e colaboradores mostraram pela primeira vez que a desregulação da via Hippo, perdendo sua função de inibidora dos fatores YAP/TAZ, está diretamente relacionada a um subgrupo específico de meduloblastoma (Schwalbe *et al.*, 2017). Este subgrupo se insere no grupo de Sonic Hedgehog (SHH) para crianças de 0 a 4 anos de idade com uma taxa de sobrevivência de cerca de 58% e taxa de metástase de cerca de 28%. Apesar da relação com a Via Hippo ter sido definida, ainda existem poucos estudos em meduloblastoma para melhor entender a contribuição dessa via para o desenvolvimento dos tumores.

### 1.3. Via de sinalização Hippo

A Via Hippo é uma via de sinalização celular que foi primeiramente descrita em *Drosophyla*, e está altamente conservada em mamíferos. Ela foi inicialmente descrita como a responsável pela regulação do crescimento de órgãos durante o desenvolvimento e associada ao reparo tecidual no adulto, mas posteriormente foi também relacionada ao processo de tumorigênese (Dong *et al.*, 2007; Harvey, Zhang, & Thomas, 2013; Johnson & Halder, 2013; Zhao, Tumaneng, & Guan, 2011). Como representado na Figura 3, a via Hippo é estimulada por fatores que se encontram ou interagem com junções de adesão e oclusão, desencadeando uma cascata de fosforilações. Nessa cascata encontram-se alguns de seus componentes principais como, em humanos, a proteína serina/treonina-quinase 3 (Mst2), associada à proteína Salvador (Sav1), que fosforila a *Large tumor suppressor kinase* (Lats 1 e 2). Estes, por sua vez, fosforilam e inibem o efetor final da via, a *Yes-Associated Protein* (YAP), e seu co-fator *PDZ-binding motif* (TAZ), impedindo que estes fatores consigam entrar no núcleo. Quando YAP e TAZ conseguem entrar no núcleo, eles se associam a proteínas do grupo TEAD (fatores potenciadores de transcrição TEF) levando à transcrição de determinados genes. A Via Hippo age, portanto, como uma reguladora negativa de YAP e TAZ que, por sua vez, controlam o crescimento e desenvolvimento dos órgãos, regulando primordialmente a proliferação celular (Zhao *et al.*, 2011).



**Figura 3. Via Hippo de sinalização em *Drosophyla* e mamíferos.** Esquema da via Hippo, mostrando sua estimulação mecânica inicial associada a membrana e junções, e o eixo central que culmina na inibição dos fatores de transcrição YAP e TAZ - Adaptado e traduzido de Zhao *et al.* (2011).

Como observado na Figura 3, existem homólogos para todos os componentes dessa via em mamíferos, e os novos reguladores foram descritos. Um estudo importante sobre a atuação da via Hippo em mamíferos observou que a superexpressão de YAP em células hepáticas de camundongos provocou um aumento da proliferação destas células, culminando no aumento do tamanho do órgão seguido de formação de tumores (Dong *et al.*, 2007).

Devido à sua atuação durante o desenvolvimento e na regulação do tamanho dos órgãos, a via Hippo também é relacionada às células-tronco. Lian e colaboradores estudaram o efeito de YAP e TAZ no comportamento de células-tronco de camundongos. Eles demonstraram que o silenciamento de YAP em células-tronco embrionárias causa redução da pluripotência destas células, enquanto que a superexpressão de YAP impede a diferenciação e leva a uma maior reprogramação de células-tronco induzidas (Lian *et al.*, 2010). Outros estudos sobre a influência de YAP e TAZ sobre as células-tronco também mostram que estes conferem capacidade proliferativa e inibem a diferenciação destas células (Cao, Pfaff, & Gage, 2008; Harvey *et al.*, 2013; Tamm, Böwer, & Annerén, 2011) e ainda mostram que a depleção de outro componente da via, como LATS, pode melhorar a formação de células pluripotentes induzidas (Qin *et al.*, 2012).

Conforme citado anteriormente, desregulações associadas a esta via podem levar à hiperplasia de um órgão e, se continuada, à tumorigênese (Dong *et al.*, 2007; Halder & Camargo, 2013; Harvey *et al.*, 2013; Johnson & Halder, 2014). YAP e TAZ são dois fatores de transcrição que regulam a expressão de diversos genes relacionados à proliferação celular e proteção contra apoptose, como *c-myc*, *survivina*, *Sox2*, *CTGF* e *cyr61*, e a hiper-ativação desses fatores vem sendo associada a diversos tipos de câncer. Zhang e colaboradores mostraram em seu trabalho que a inibição de *Merlin* (*Nf2*), um dos iniciadores da via Hippo, está associada à formação de tumor no fígado de camundongos, e verificaram em seguida que a deleção do gene de YAP especificamente no fígado suprimiu a formação do tumor quando feita simultaneamente à inibição de *Merlin* (Zhang *et al.*, 2010). O estudo da via em diferentes tumores mostrou que esta parece estar inativada enquanto ocorre o aumento da atividade de YAP e TAZ (Harvey *et al.*, 2013; Hiemer,



Szymaniak, & Varelas, 2014; Xia *et al.*, 2014) (Figura 4).

Além da Via Hippo, já foram descritas algumas outras formas de regulação de YAP e TAZ, como: mecanotransdução, rotas metabólicas e outras vias de sinalização como a via de WNT/ $\beta$ -catenina (Wu *et al.*, 2022). Isso destaca a importância de se aprofundar no funcionamento desses mecanismos, e de buscar a relação desses novos genes de interesse com genes clássicos já bem descritos que possuem funções similares. Um dos genes que pode estar relacionado com a regulação de YAP é o gene codificador de OCT4, já que existem fortes evidências que estes dois fatores de transcrição co-regulam a expressão de Sox2 (Bora-Singhal *et al.*, 2015), outro gene muito importante na manutenção do fenótipo tronco das células e que também é um regulador de OCT4. Outros trabalhos, como o de Basu-Roy e colaboradores e Seo e colaboradores, mostram em linhagens de osteossarcoma uma regulação da Via Hippo pelo próprio Sox2 para aumentar atividade de YAP, ao agir para inibir iniciadores da Via Hippo como o *Merlin* (Basu-Roy *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2013), e essa antagonização da Via Hippo resulta numa manutenção do fenótipo tronco nas células tumorais afetadas. De fato, diversas vias de sinalização que controlam o fenótipo tronco se auto-regulam transcricionalmente, como a interação entre OCT4, Sox2 e Nanog (Jaenisch *et al.*, 2008. Kellner *et al.*, 2012), tornando plausível a hipótese que OCT4 possa controlar a expressão de YAP.

#### **1.4. Fator de transcrição OCT4**

OCT4 ganhou muita atenção em 2006 por ser um dos quatro fatores de Yamanaka, que são genes descritos como os mais importantes para a reprogramação de células somáticas na geração das células pluripotentes induzidas (iPSCs) (Takahashi e Yamanaka, 2006), sendo considerada indispensável para este processo

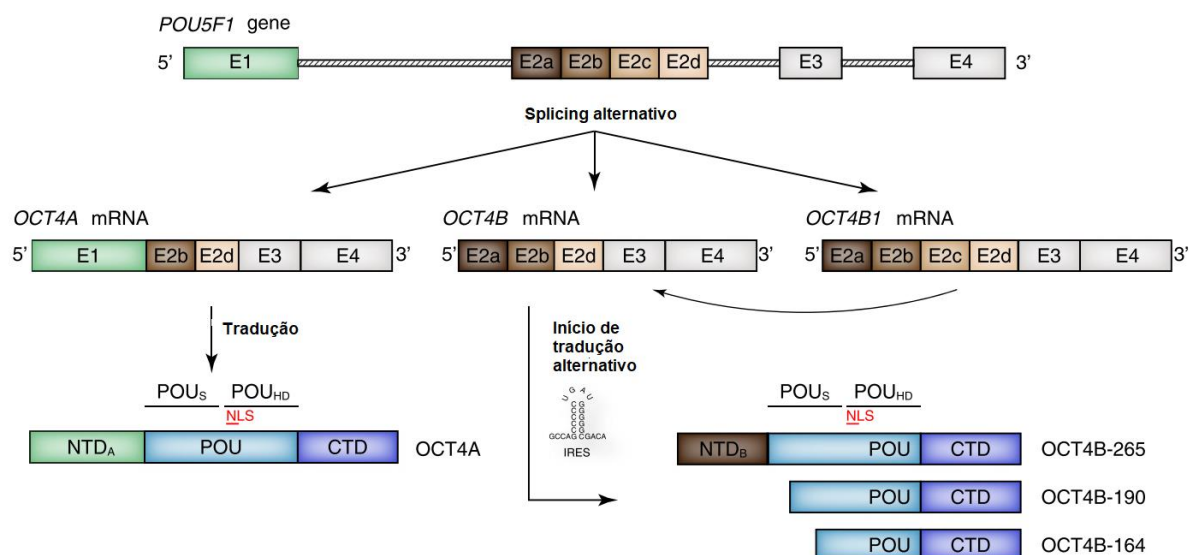
(Jerabek, Merino, Schöler, & Cojocaru, 2014; Pardo *et al.*, 2010; Shi & Jin, 2010). O OCT4 foi primeiramente descrito em camundongos, codificado pelo gene *Pou5f1*, como um fator de transcrição específico de células-tronco embrionárias e células germinativas (Palmieri *et al.*, 1994). Durante o desenvolvimento, o OCT4 é altamente expresso nas células embrionárias pluripotentes, mas sua expressão cai rapidamente durante a diferenciação celular, e foi mostrado que existe uma relação entre a quantidade de OCT4 expresso e a determinação do tipo celular a ser formado (Shi & Jin, 2010).

Além de diversos fatores regularem a expressão de OCT4 (incluindo mecanismos epigenéticos), tanto no nível genético quanto proteico, o OCT4 também possui muitos parceiros de transcrição na regulação de genes responsáveis pela manutenção de pluripotência (Shi e Jin, 2010). Entre estes parceiros, o melhor caracterizado é o SOX2, e seu complexo junto com OCT4 leva à expressão de genes responsáveis por pluripotência e autorrenovação, e inclusive a manutenção da expressão do próprio OCT4. Além disso, também reprimem a expressão de genes responsáveis pela diferenciação celular (Shi e Jin, 2010). Em outro trabalho do nosso grupo, Silva e colaboradores demonstraram que linhagens de meduloblastoma apresentando superexpressão da isoforma OCT4A possuíam maiores capacidades de autorrenovação, geração de esferas tumorais e de invasão, se mostrando mais agressivas do que as linhagens com níveis normais de expressão. Quando testados *in vivo*, camundongos que foram inoculados com células superexpressando o OCT4A apresentaram taxas reduzidas de sobrevivência e desenvolveram metástases mais rapidamente (Silva *et al.*, 2017).

Rodini e colaboradores mostraram em seu trabalho que pacientes pediátricos

de meduloblastoma apresentaram maior expressão do marcador de célula-tronco neural CD133, e dos marcadores de pluripotência Lin28 e OCT4 (Rodini *et al.*, 2011). Nessas amostras, porém, o OCT4 estava expresso de forma mais esporádica, sendo detectável apenas em 48% dos tumores, mas foi observado que sua alta expressão estava diretamente correlacionada com o pior prognóstico dos pacientes. A diferença da média de tempo de sobrevivência entre pacientes que apresentavam baixa expressão de OCT4 em comparação com os que apresentavam alta expressão, foi de 153 meses para os com alta expressão (12 anos e 9 meses) e 6 meses para os com baixa expressão, ilustrando o OCT4 como um bom marcador prognóstico em meduloblastoma (Rodini *et al.*, 2011). Resultados similares também foram observados em tumores no fígado e tumores neuroblásticos, com maior expressão de OCT4 levando a uma pior chance de sobrevivência e maior agressividade tumoral (Monferrer *et al.*, 2019, Dong *et al.*, 2012)

Em humanos, esse fator possui três transcritos; OCT4A, OCT4B e OCT4B1, e quatro isoformas proteicas; OCT4A, OCT4B-190, OCT4B-265, e OCT4B-164 (Wang *et al.*, 2010). Neste projeto estaremos investigando o OCT4, mas tentando focar na isoforma OCT4A a mais similar com o modelo murino (cerca de 87% de identidade na sequência de aminoácidos) e a única capaz de manter o fenótipo tronco nas células pluripotentes embrionárias (Jerabek *et al.*, 2014; Shi & Jin, 2010). A isoforma OCT4B não é de tanto interesse no estudo das células-tronco tumorais, visto que desempenha papel relacionado à resposta ao stress celular (Wang *et al.*, 2010). Por ser a isoforma descrita mais recentemente, ainda não é muito clara a função de OCT4B1, apesar de inicialmente parecer poder ser outro marcador de fenótipo tronco. Na Figura 4 estão ilustradas as diferentes isoformas de OCT4, e os transcritos resultantes de splicing alternativo.



**Figura 4. Transcritos alternativos do gene *Pou5f1*.** Representação do gene *Pou5f1* e seus diferentes transcritos resultantes de splicing alternativo: OCT4A, OCT4B e OCT4B1. Adaptado de Jerabek *et al.*, (2014).

A grande similaridade entre os diferentes transcritos de OCT4 contribui para uma crescente complicação no estudo desse fator de transcrição, pois muitos trabalhos reportam seus resultados sem indicar sobre qual dos transcritos estão se referindo, ou usando marcadores generalistas para OCT4. Isso resulta em uma confusão sobre as diferentes funções entre esses transcritos, que acabam sendo atribuídas ao OCT4 como um todo (Kotoula *et al.*, 2007, Liedtke *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2010, Xu *et al.*, 2015). Um exemplo disso são trabalhos que contestam a confiabilidade de OCT4 como um marcador de pluripotência, ao apresentarem resultados indicando altas expressões desse gene em linhagens celulares mais diferenciadas, como células-tronco de adulto, certas linhagens tumorais, células mononucleares de sangue periférico, entre outras (Liedtke *et al.*, 2008). É preciso ter cautela no estudo desse gene, e clareza sobre qual isoforma está sendo observada, principalmente em células diferenciadas, onde a expressão de OCT4B pode aparecer

como um falso positivo de OCT4A.

Visto que a atividade de OCT4 é indispensável na manutenção de das células-tronco, e que sua atividade pode estar sendo regulada pelo YAP cuja atividade é exacerbada em tumores, é interessante investigar os exatos mecanismos regendo a tumorigênese pela desregulação da Via Hippo, e se os efeitos como o aumento da agressividade tumoral e presença de células-tronco tumorais são decorrentes de uma comunicação entre OCT4 e YAP, e como a falta de um ou de outro afeta o fenótipo tronco das linhagens tumorais de meduloblastoma.

### **1.5. Células-tronco Tumorais**

Primeiro descritas como “células iniciadoras de tumor” (Lapidot *et al.*, 1994), as células-tronco tumorais são células tumorais com propriedades de células-tronco, tais como: capacidade de autorrenovação, maior potencial de diferenciação, e maior potencial tumorigênico. Em seu trabalho, Lapidot e colaboradores identificaram e isolaram pela primeira vez uma população específica de células tumorais de Leucemia Mieloide Aguda que eram capazes de iniciar a formação de tumor em camundongos imunossuprimidos, em contraste com o resto das células que possuem baixa capacidade proliferativa (Lapidot *et al.*, 1994).

A partir desse trabalho, muitas outras evidências da presença dessas células começaram a ser reportadas, como em câncer de mama (Al-Hajj *et al.*, 2003) e tumores cerebrais (Singh SK *et al.*, 2003, Gilbertson e Rich, 2007). Com esses trabalhos também começaram a ser elucidados alguns dos marcadores para identificação dessas células, tais como CD34, CD44, CD24, CD29, CD90 e um clássico de tumores cerebrais, o CD133 (Yin *et al.*, 1997, Uchida *et al.*, 2000, Mizrak *et al.*, 2007). As populações celulares com fenótipo tronco são populações

enriquecidas para esses genes, e podem ser possíveis alvos para auxiliar no desenvolvimento de novas terapias.

Ainda não é totalmente elucidada a origem das células-tronco tumorais, mas uma das teorias mais aceitas é de que elas surgem a partir de células progenitoras/tronco normais que adquirem a habilidade de formar tumores após alguma mutação genética ou alteração ambiental (Hanahan e Weinberg, 2011, Yu *et al.*, 2012). Outra teoria defende que elas surgem a partir de células somáticas normais que adquirem características de células-tronco e comportamento maligno após alguma mutação genética ou alteração em proteínas (Visvader e Lindeman, 2008, Yu *et al.*, 2012).

Essas populações celulares são importantes no estudo de câncer por seu papel na metástase, visto seu alto potencial de invasão, e por sua capacidade de gerar uma população tumoral muito heterogênea (Hanahan e Weinberg, 2011. Hanahan, 2022). De fato, a heterogeneidade tumoral é um dos principais dificultadores para tratamento do câncer principalmente por aumentar a complexidade na determinação de alvos terapêuticos e por causa dos diferentes tipos celulares responderem desigualmente aos tratamentos convencionais (Yu *et al.*, 2012; Ayob *et al.*, 2018; Chang, 2016). Por isso, torna-se importante desenvolver tratamentos que tenham como alvos essa população mais reduzida de células (até 25% da população tumoral) (Yu *et al.*, 2012), para inviabilizar a renovação tumoral.

Uma técnica *in vitro* que se mostrou muito eficiente em ajudar a estudar essas células-tronco tumorais é a cultura de esferas tumorais, que são culturas celulares tridimensionais, nas quais as células crescem em suspensão, formando aglomerados. Esse tipo de cultivo celular se mostrou muito eficiente em enriquecer a população de células com células-tronco tumorais (Silva *et al.*, 2017; Venugopal *et al.*, 2012). Esse

protocolo mimetiza melhor o ambiente *in vivo* no qual o tumor se desenvolve, que é um ambiente 3D, não bidimensional como o representado por cultivos em monocamada (Yamada & Cukierman, 2007). Silva e colaboradores demonstraram também que linhagens de meduloblastoma cultivadas em meio de neuroesfera, formando os aglomerados, expressaram mais marcadores de células neuroprogenitoras, como o CD133<sup>+</sup>, do que culturas de células aderentes em monocamada, cultivadas em meio com soro (Silva *et al.*, 2017). Panosyan e colaboradores também mostraram que a capacidade de células tumorais de formar esferas autorrenovadoras e com capacidade de diferenciação representa um pior prognóstico para os pacientes com tumores embrionários dos quais estas células foram extraídas, incluindo em pacientes com meduloblastoma (Panosyan *et al.*, 2010). Por fim, em dados não publicados do nosso grupo pesquisa, verificamos que a inibição da expressão de YAP com o composto *visudyne* (popularmente conhecido como Verteporfina) em células de meduloblastoma reduz drasticamente a capacidade dessas células formarem esferas tumorais (Cortez *et al.*, 2023 – em preparação).

## **2. Justificativa e objetivos**

O meduloblastoma é um tumor pediátrico maligno do SNC que apresenta alta mortalidade nos pacientes que o possuem. Resumidamente, essa agressividade deriva da ineficácia dos tratamentos disponíveis devido a heterogeneidade celular e molecular desses tumores. Essa heterogeneidade é, em grande parte, mantida pela ativação de vias de sinalização responsáveis pela manutenção do fenótipo tronco nos tumores, como os efetores da Via Hippo (i.e. YAP e TAZ) e o fator de transcrição OCT4. De fato, entender como essas vias se correlacionam e se auto-regulam é de extrema importância para o melhor entendimento do meduloblastoma com o propósito de desenvolver novas formas de terapias no futuro. Desta forma, o objetivo principal deste trabalho é entender melhor a relação entre a Via Hippo, e seu efetor final, YAP, e a atividade da proteína OCT4 - descrita extensivamente como um regulador central da manutenção da pluripotência em células-tronco, e também anormalmente expressa em células-tronco tumorais (Shi & Jin, 2010) - em linhagens de meduloblastoma. Também avaliaremos a importância da proteína OCT4 para a agressividade e autorrenovação de células de linhagens de meduloblastoma que possuem diferentes níveis de expressão da proteína YAP. Com isso esperamos comparar se as diferenças fenotípicas observadas com a diferente expressão de YAP são resultado apenas da sua própria expressão, ou se existe uma interação mais complexa entre YAP e esse gene mais estabelecido como importante fator envolvido no fenótipo tronco de células normais e tumorais.



## 2.1. Objetivos específicos

- a) **Avaliar a expressão de OCT4 em linhagens de meduloblastoma com diferentes níveis de YAP.**
- b) **Silenciar o gene codificador de OCT4 em linhagens de meduloblastoma com diferentes níveis de expressão de YAP, avaliando o impacto na capacidade de formação de esferas tumorais.** As células descritas em “a” foram submetidas ao silenciamento de OCT4 pela técnica de RNA de interferência (RNAi). Foram utilizadas três sequências de siRNA, sendo uma sequência controle (Duplex CT) e três sequências para o silenciamento transitório de OCT4 (Duplex A e Duplex C). Após, os níveis expressos dos genes codificadores de OCT4 e YAP, além dos genes alvo da via Hippo *Cyr61*, *Birc5* e *CTGF* foram avaliados por RT-qPCR. Também avaliamos os níveis proteicos de OCT4 por Western Blot. Por fim, analisamos o impacto da combinação das alterações CRISPR-YAP e siRNA-OCT4 na formação de esferas tumorais.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Cultura de Células

Foram utilizadas neste estudo duas linhagens de meduloblastoma humano; a linhagem comercial Daoy (ATCC), caracterizada por ser meduloblastoma do tipo SHH, com deficiência de TP53, um conhecido supressor tumoral (Ivanov *et al.*, 2016) e a linhagem derivada de paciente USP13-Med (Silva *et al.*, 2015), caracterizada como meduloblastoma do Grupo 3/ 4. As células foram cultivadas em meio Minimum Essencial Medium (MEM) (*Lifetechnologies*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, *Gibco*), 1% de antibiótico (Pen-Strep, *Gibco*) e Normocin (*InVivoGen*). São linhagens aderentes aos frascos de cultura e foram subcultivadas ao atingirem cerca de 80% de confluência, ao menos duas vezes por semana. Os subcultivos em todas as linhagens foram realizados com uso de tripsina (*Gibco*), mantida por 5-10 minutos a 37°C, e então neutralizada com o meio para re-plaqueamento. Todas as culturas foram mantidas em condições padrão (37°C, com 95% umidade e 5% de CO<sub>2</sub>) e foram testadas quanto a contaminação por *Mycoplasma* periodicamente com o kit MycoAlertPLUS (Lonza). Células das linhagens de meduloblastoma Daoy e USP13-Med foram previamente transformadas pela técnica de CRISPR-Cas9 para extinguir a expressão dos genes YAP no projeto de pós-doutoramento da Dra. Beatriz Cortez (Cortez *et al.*, 2023 – em preparação). Após o processo de clonagem, foram isolados pelo menos 3 clones de cada linhagem, sendo um controle (expressando altos níveis de YAP) e o restante com ausência de expressão de YAP. As células usadas para a linhagem Daoy foram: Daoy C1 (controle com expressão normal de YAP), Daoy yc21 (sem expressão de YAP, aqui referida como YAP-KO) e Daoy yc21t19 (sem expressão de YAP e baixa expressão de TAZ, aqui referida como YAP-KO+TAZ-KD) e para a linhagem USP13-Med foram: USP13 C12 (Controle), USP13

yc14 (aqui referida como YAP-KO<sup>A</sup>) e USP13 yc20 (aqui referida como YAP-KO<sup>B</sup>), ambas sem expressão de YAP.

### **3.2. Formação de Esferas Tumorais**

Para o cultivo de esferas tumorais foi utilizado o meio Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12 (DMEM/F12), suplementado com Epidermal Growth Factor (EGF, *Preprotech*), Fibroblast Growth Factor (FGF, *Preprotech*), N-2 e B-27. Cada 50mL de meio para neuroesferas são utilizados 48,5mL de DMEM/F12, 1mL de B-27 50x (*Gibco*), 500µL de N-2 100x (*Gibco*) e 10µL de EGF (*Preprotech*) e FGF (*Preprotech*, concentração final 20 ng/ml). As células foram cultivadas em placas de 96 poços tratadas para impedir a adesão celular (*Ultra-Low Attachment*, Corning). O volume total de meio para cada poço foi de 100 µL.

As células de cada linhagem foram tripsinizadas e o volume de células necessário para plaqueamento foi determinado após contagem do número de células utilizando o contador *Countess II FL*, *Life Technologies*. Para as linhagens Daoy e USP13-Med foram utilizadas 10<sup>4</sup> células por poço, e as fotos foram tiradas usando o microscópio Evos após 4 e 7 dias de cultivo. Para a contagem do número de esferas e medida de seus tamanhos foi usado o programa ImageJ (NIH).

### **3.3. Tratamento com RNA de interferência para o silenciamento de OCT4**

Os duplex de RNAs de interferência (RNAi) foram adquiridos pela empresa OriGene. A diluição inicial foi feita conforme o protocolo fornecido pela empresa, no qual os Duplex foram preparados na concentração final de 20 µM. Para este experimento foi utilizado uma sequência Duplex Controle (Duplex CT) e três sequências para o silenciamento de OCT4 (Duplex A-C). A metodologia utilizada para

o silenciamento de OCT4 nas células de meduloblastoma foi baseado em um protocolo previamente publicado com linhagens tumorais de mama com as mesmas sequências de Duplex (Nguyen *et al.*, 2019), realizando duas transfecções sequenciais com o RNAi, totalizando 5 dias de experimento. Resumidamente, as células foram plaqueadas no dia 1 em placas de 6 wells com meio normal, para um total de  $10^5$  células por poço. No dia 2 foi feita a primeira transfecção, com a concentração de RNAi de 20nM para as Daoy, e 10 nM para as USP13-Med. Essa diluição é feita seguindo o protocolo da Lipofectamina usada, a *Lipofectamina RNAiMAX*, *ThermoFisher*. No dia 3 é realizada a troca desse meio para uma segunda transfecção idêntica, e as células crescem até o dia 5 quando são tripsinizadas para a extração de RNA ou proteína.

Para o mix de transfecção, é usado 150 $\mu$ L de Opti-MEM (1x) (*Gibco*), com 3 $\mu$ L ou 1,5 $\mu$ L de RNAi a 2 $\mu$ M, e 150 $\mu$ L de Opti-MEM com 5 $\mu$ L de Lipofectamina por poço (a variação na quantidade de RNAi depende da concentração final desejada, 3 $\mu$ L para 20nM e 1,5 $\mu$ L para 10nM). Ambos os mix são misturados e o mix final é incubado por cerca de 15 minutos antes de ser administrado sobre as células. Para cobrir a área do poço inteiro e evitar que o poço seque no período da transfecção, é adicionado um mínimo de meio Minimum Essencial Medium (MEM) (*Lifetechnologies*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), sem antibiótico. As células controle receberam a mesma concentração de duplex controle que as células tratadas com RNAi. Após uma primeira transfecção, optamos por não utilizar o duplex B por não apresentar um efeito inibitório de OCT4 tão pronunciado quanto os duplexes A e C.

### **3.4. Extração de RNA**

A lise das células controle e tratadas para obtenção de RNA foi realizada sempre no quinto dia após o início do tratamento, seguindo-se o protocolo do RNEasy MiniKit (Qiagen Inc). As células cultivadas em monocamada foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O pellet foi então ressuspensionado em 2mL de PBS e centrifugado novamente. Durante esta centrifugação foi preparada a solução para lise das células com 350 µL de tampão RLT Lysis Buffer (Qiagen) e 3,5 µL de β-mercaptoetanol. Após a centrifugação, todo o PBS foi removido e o pellet ressuspensionado vigorosamente na solução de lise. As amostras foram então armazenadas a -80° C ou utilizadas imediatamente para as etapas seguintes do protocolo de extração de RNA. Para obtenção do RNA das amostras, em termos gerais, a solução contendo as células lisadas foi misturada com 350 µL de etanol 70%, e centrifugada em uma coluna com afinidade a ácido nucleicos fornecida pelo próprio fabricante do Kit. A partir deste momento segue-se etapas de centrifugação da coluna com diferentes tampões, como uma forma de lavagem para a purificação do RNA da amostra. Após estas lavagens, foi usada uma solução de DNase I em Buffer RDD para degradação do DNA presente na coluna de extração. Após mais algumas lavagens, foi realizada a eluição do RNA com água RNase-Free (entre 30 e 50 µL dependendo da quantidade da amostra). A concentração de RNA foi então verificada pelo espectrofotômetro Nanodrop a 260 nm. A pureza do RNA foi verificada pela razão de absorvância 260/280. Uma razão aproximada de 2.0 é considerada “pura” para amostras de RNA.

### 3.5. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA é realizada a partir de um cálculo de quanto da amostra de RNA obtida na extração é necessária para se obter 1 µg de RNA. Em um tubo de 0,2 mL foi colocado esta quantidade de RNA, 1 µL de Oligo dT a 50 µM (*Life Technologies*), 1 µL de dNTP Mix a 10 mM (*Life Technologies*) e completado para 13 µL com água tratada com Dicarbonato de Dietila (água DEPC) (*Life Technologies*). A solução foi incubada em termociclador por 5 minutos a 65°C e 1 minuto a 4°C. Após a incubação, foram adicionados 1 µL de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (*Life technologies*), 1 µL de Superscript® II Reverse Transcriptase (*Life Technologies*), 1 µL de ditioneitol (do inglês Dithiothreitol, DTT) a 0,1 M (*Life Technologies*) e 4 µL de 5X First-Strand Buffer (*Life Technologies*). O cDNA foi obtido após o seguinte ciclo: 60 minutos a 50°C, 15 minutos a 70°C e 1 minuto a 4°C. As amostras são então armazenadas a -20°C até a realização dos experimentos de RT-qPCR (do inglês *Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction*).

### 3.6. PCR em Tempo Real

Para cada reação de PCR quantitativo (qPCR) foi utilizado 1 µL de cada primer a 10µM, 2 µL de amostra de cDNA (totalizando 10 ug de material genético), 8,5 µL de água (DEPC) e 12,5 µL de Power SYBR Green Master Mix 2X. Os alvos testados foram OCT4, OCT4A, YAP, Sox2, Birc5, Cyr61 e CTGF, e todos os primers foram adquiridos da empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT). As sequências usadas, assim como as temperaturas de anelamento (TA) usadas estão a seguir:

#### **Sox2**

**Forward** - CCA TCC ACA CTC ACG CAA AA

**Reverse** - TAT ACA AGG TCC ATT CCC CCG     **TA:** 64°C

## **YAP**

**Forward** - TGT CCC AGA TGA ACG TCA CAG C

**Reverse** - TGG TGG CTG TTT CAC TGG AGC A **TA: 62°C**

## **OCT4**

**Forward** - TCC CAT GCA TTC AAA CTG AGG

**Reverse**- CCA AAA ACC CTG GCA CAA ACT **TA: 62°C**

## **OCT4A**

**Forward** - TCG CAA GCC CTC ATT TCA CCA

**Reverse** - GGA CTC CTC CGG GTT TTG CT **TA: 64°C**

## **Birc5**

**Forward** - AGGACCACCGCATCTCTACA

**Reverse** - TTTCCTTTGCATGGGGTCGT **TA: 62°C**

## **Cyr61**

**Forward** - AAGGAGCTGGGATTCGATGC

**Reverse** - CTTGCCCTTTTTTCAGGCTGC **TA: 62°C**

## **CTGF**

**Forward** - ATG ATG CGA GCC AAC TGC CTG

**Reverse** - CGG ATG CAC TTT TTG CCC TTC TTA A **TA: 68°C**

## **GAPDH**

**Forward** - GCA TCC TGG GCT ACA CTG A

**Reverse** - CCA CCA CCC TGT TGC TGT A **TA: 62°C**

Para cada gene foi realizado o experimento em triplicata (3 reações por amostra controle e 3 reações por amostra tratada). As reações foram feitas no equipamento *7500 PCR REAL TIME SYSTEM (Applied Biosystems)*, usando o

reagente *PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)* atentando para as diferentes temperaturas de anelação dos primers. Na análise dos resultados, a expressão dos genes de interesse foi quantificada utilizando uma curva padrão para cada gene, normalizada pela expressão de GAPDH, e para apresentação dos resultados o valor da amostra controle foi considerado 1. Nós não fomos capazes de detectar a expressão da isoforma *OCT4A* e *Sox2* em nenhuma das linhagens, provavelmente devido às suas baixíssimas expressões em células diferenciadas.

### **3.7. Extração de proteína e quantificação por BCA**

A lise das células transfectadas controle e silenciadas para obtenção de proteínas foi realizada também sempre no quinto dia após o início do tratamento com o RNAi para OCT4. Para isso, as células foram ressuspendidas em 100-300µL de RIPA Buffer (*Sigma-Aldrich*) com inibidor de protease-fostatase e transferidas para Eppendorfs de 1,5 mL. As células foram então sonicadas em gelo por cerca de 15 minutos enquanto a centrífuga é preparada para estar a 4°C. Após sonicar, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 15000 RPM, e o sobrenadante foi transferido para novos eppendorfs. Neste ponto as amostras foram ser armazenadas a -80°C.

Para a quantificação proteica das amostras, foi usado o *Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific- REF 23227)* seguindo o protocolo disponibilizado pela empresa. Primeiro são preparados os 9 *Standards* que servirão de padrão para a detecção de proteínas, em diluição seriada de Albumina (*BSA*), em concentrações desde 2000µg/mL até o controle Branco (0µg/mL). A seguir é seguida a fórmula no protocolo para preparar o Reagente de Trabalho que será o meio onde as proteínas serão quantificadas (incluindo as *Standards*). 2mL do Reagente são adicionados a



10 $\mu$ L de cada *Standard* e réplica de amostra em poços de placa de 96 *wells Flat* (*Corning*) que é então incubada a 37°C por 30 minutos. Após o período de incubação, a placa é resfriada a temperatura ambiente, e pode ser lida no Espectrofotômetro *Epoch* (*BioTek*). O brilho então é processado para remover o Branco e normalizar pela curva de Albumina para se obter uma estimativa da quantidade de proteína de cada amostra.

### **3.8. Análise por Western Blot**

Para a análise de expressão proteica foram realizados ensaios de Western Blot. As proteínas analisadas foram OCT4, OCT4A, YAP e  $\beta$ -Actina como alvo controle. De início as amostras armazenadas no freezer -80°C foram diluídas em tampão de corrida *4x Laemmli Sample Buffer* (*Bio-Rad*), de acordo com a quantidade necessária para o número e tamanho dos poços, cerca de 10-20 $\mu$ L por poço em géis com 10 poços de 1mm de espessura. A mistura foi submetida a um aquecimento em banho seco a 95°C por 5 minutos, seguido de um choque térmico colocando os eppendorfs em gelo. Enquanto isso, foram preparados os géis de corrida, usando o kit da *Bio-Rad*, *TGX FastCast Acrylamide Solutions* que foram então inseridos na cuba de corrida submersos em um tampão de corrida adequado. As amostras foram então pipetadas nos poços, e se inicia a corrida com 5-10 minutos em 100V para o empacotamento das proteínas, seguido de cerca de 1 hora de corrida a 120V.

Uma vez que a corrida é finalizada, foi feita a transferência das proteínas para uma membrana usando o equipamento *Iblot 2 Gel Transfer Device* (*Thermo-Fisher*). O bloqueio foi feito com uma solução de leite diluído em TBST a 5%, e as membranas foram mantidas overnight com o anticorpo primário do alvo de interesse. No dia seguinte, foram feitas 4 lavagens consecutivas de 5 minutos cada uma alternando-se

TBS e TBST, seguidas de uma incubação de 2 horas e meia com o anticorpo secundário. Para finalizar, as membranas foram lavadas novamente 4 vezes de 10 minutos cada uma alternando TBS e TBST, e a membrana foi incubada por 5 minutos com *Clarity Western ECL Substrate* adquirido da Bio-Rad, que é uma solução para estimular a quimioluminescência. A imagem foi revelada usando o equipamento ImageQuant LAS 4000Mini (*GE Healthcare*).

Os anticorpos usados foram: para OCT4A o anticorpo *OCT4-A (C52G3) Rabbit* obtido da *cell signalling*, diluído na concentração de 1:1000 em solução de TBST com 2,5% leite Mólico. Para YAP, o anticorpo *YAP (D8H1X) XP® Rabbit* obtido também da *cell signalling*, diluído na concentração de 1:2000 em solução de TBST com 2,5% leite Mólico. Para OCT4, foi usado o anticorpo *ab181557* da *Abcam*, na concentração de 1:1000 em TBST. E por fim o anticorpo para *ab49900* para  $\beta$ -Actina também obtido da *Abcam*, diluído na concentração de 1:15000 em TBST. Todos os anticorpos foram usados nas concentrações sugeridas pelos fabricantes, e com exceção da  $\beta$ -Actina, que é um anticorpo conjugado, todos foram marcados com o anticorpo secundário Anti-Rabbit. O OCT4A só pôde ser detectado na linhagem Daoy, e para fins de não gerar confusão com a nomenclatura, apresentaremos os resultados como OCT4 em geral.

### **3.9. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas comparando os grupos com expressão normal de YAP (Controle) com os grupos com inibição de YAP (YAP-KO) e dos grupos sem silenciamento de OCT4 (Controle-KD) com os grupos silenciados (OCT4-KD<sup>A</sup> e OCT4-KD<sup>B</sup>) e foram apresentadas graficamente como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças entre os grupos para comparar os diferentes níveis de

expressão e médias de números de esferas foram realizadas por análise de variância *One-Way ANOVA* seguido de teste de Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças para \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Os gráficos foram gerados usando o software *GraphPad PRISM 6*.

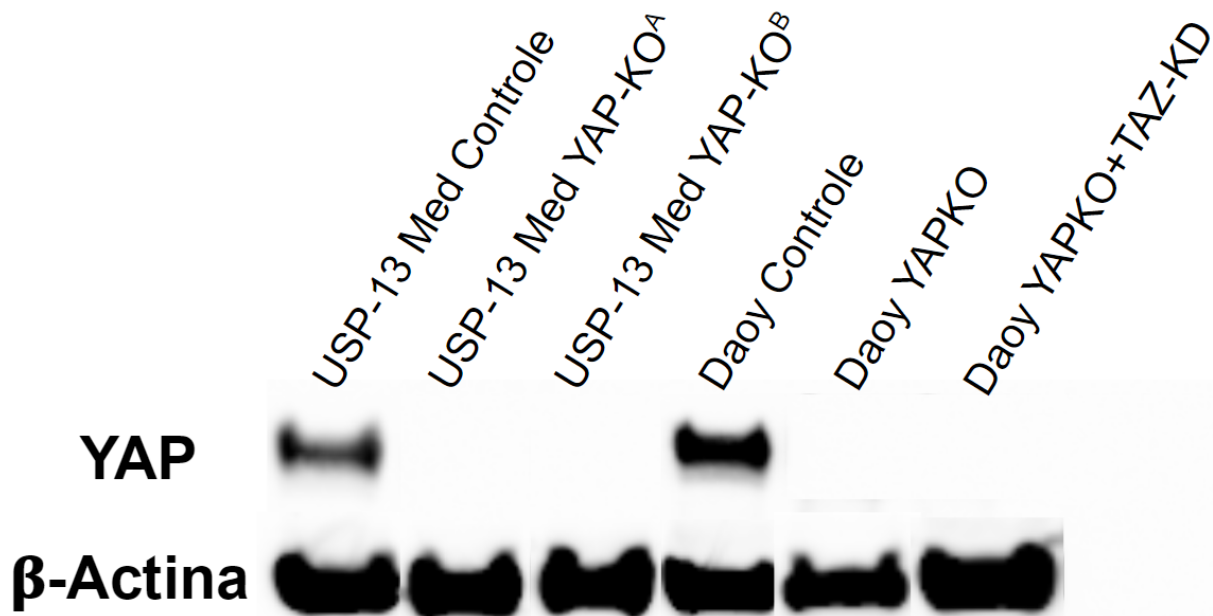
## 4. Resultados

### 4.1. Validação do modelo celular e análise da expressão gênica de OCT4 em células de meduloblastoma com Knock-Out para YAP

A hipótese deste trabalho é de tentar compreender melhor a relação entre o efetor final da Via Hippo, YAP, que vem recebendo cada vez mais atenção devido à sua correlação com o desenvolvimento de diversos tipos de tumores (Dong *et al.*, 2007; Halder & Camargo, 2013; Harvey *et al.*, 2013; Johnson & Halder, 2014), e o fator de transcrição OCT4, que já é um conhecido protagonista nos estudos de células-tronco, relacionado com características como pluripotência e maior resistência a apoptose de células, e que é descrito como um forte marcador de agressividade tumoral quando expresso em células tumorais, inclusive contribuindo para a geração das células-tronco tumorais (Rodini *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2017).

Para explorar essa relação, as linhagens tumorais de meduloblastoma USP13-Med e Daoy que foram submetidas à técnica de CRISPR-Cas9 para o Knock-Out (KO) de YAP no projeto de pós-doutoramento da Dr. Beatriz Cortez (detalhes de obtenção, alterações gênicas e demais detalhes não serão abordados nessa dissertação) foram avaliadas quanto à expressão proteica de YAP por Western Blot para validação do modelo (Figura 5). Para a linhagem USP13-Med foi utilizada um clone controle sem alteração da expressão de YAP (USP13-Med Controle) e dois clones com diferentes alterações gênicas de YAP (USP13-Med YAP-KO<sup>A</sup> e USP13-Med YAP-KO<sup>B</sup>). Já para a linhagem Daoy, foi utilizado um clone controle (Daoy Controle), um clone com alteração gênica em YAP (Daoy YAP-KO) e um clone com um Knock-Down (KD) em TAZ (Daoy YAP-KO + TAZ-KD). De forma geral,

observamos alta expressão de YAP nas células controle das linhagens USP13-Med e Daoy e ausência da expressão da proteína nos demais clones YAP-KO (Figura 5).

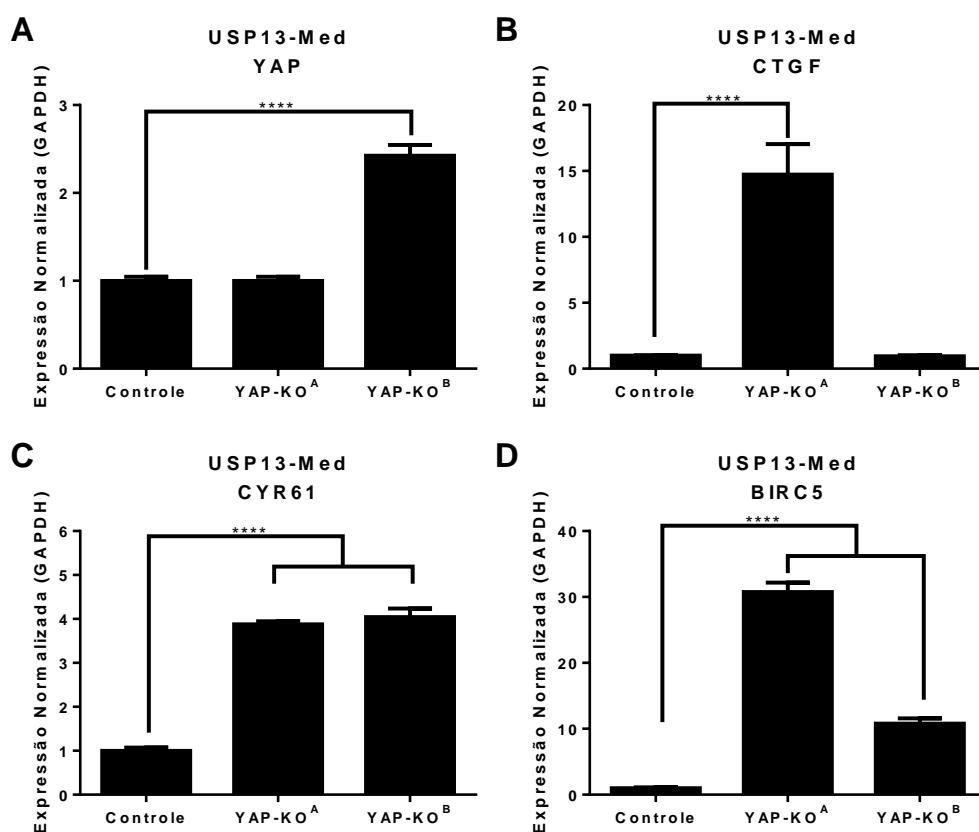


**Figura 5. Expressão proteica de YAP nos clones Daoy e USP13-Med que passaram por Knock-Out de YAP por CRISPR-Cas9.** Os clones usados para os experimentos deste trabalho foram USP13-Med Controle, YAP-KO<sup>A</sup> e YAP-KO<sup>B</sup> e Daoy Controle, YAP-KO e YAP-KO + TAZ-KD. Peso molecular YAP: 65-79 kDa. Peso molecular  $\beta$ -Actina: 45 kDa.

A seguir, para avaliar o estado de ativação da via Hippo entre as diferentes células descritas anteriormente foi comparada a expressão dos genes *YAP* e de alvos bem estabelecidos da via Hippo *CTGF*, *Cyr61* e *Birc5* por RT-qPCR.

Na linhagem USP13-Med (Figura 6), os níveis transcricionais de *YAP* não se alteraram entre as células Controle e as células que YAP-KO<sup>A</sup>, porém as células YAP-KO<sup>B</sup> apresentaram um aumento significativo de 2,4 vezes na expressão gênica de *YAP* (Figura 6A). De forma interessante, este resultado pode ser explicado pela

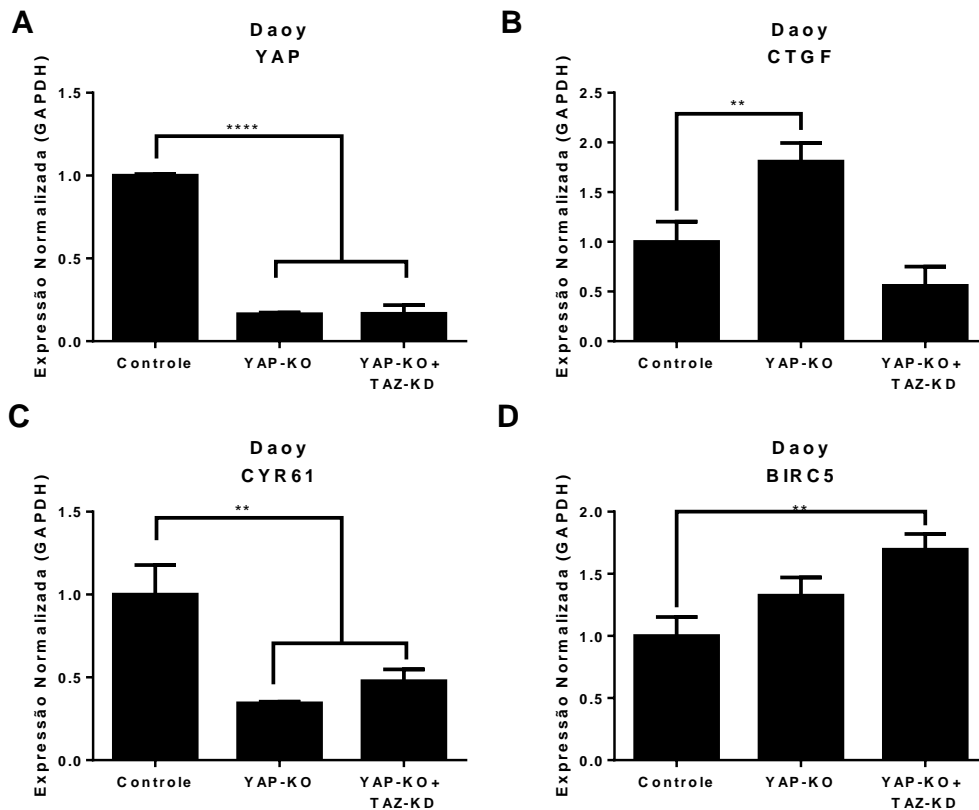
própria metodologia do CRISPR/Cas9, na qual ocorre uma pequena deleção na sequência gênica, mas isso não necessariamente acarreta na extinção da produção de RNA mensageiro. Para o gene de CTGF (Figura 6B), observamos um aumento de 14,7 vezes na sua expressão nas células YAP-KO<sup>A</sup> em relação às células Controle, e ausência de alteração de sua expressão nas células YAP-KO<sup>B</sup>. Em relação ao *Cyr61*, observamos um aumento na ordem de 4 vezes na sua expressão nos clones YAP-KO<sup>A</sup> e YAP-KO<sup>B</sup> em relação às células controle (Figura 6C). Por fim, o KO de YAP levou ao aumento significativo da expressão de *Birc5* na ordem de 30x e 10x nas células YAP-KO<sup>A</sup> e YAP-KO<sup>B</sup>, respectivamente (Figura 6D). A maior expressão desses genes-alvo pode estar associada às suas regulações transcricionais por outras vias de sinalização, como a via do fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e estímulos mecânicos para *CTGF* (Blom *et al.*, 2002); fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e via do mTOR para *Birc5* (Boidot *et al.*, 2013); e a via p38MAPK para *Cyr61* (Han *et al.*, 2003).



**Figura 6. Expressão de *YAP*, *CTGF*, *Cyr61* e *Birc5* em células de meduloblastoma USP13-Med controle e CRISPR para YAP.** Quantificação dos níveis transcricionais de (A) *YAP*, (B) *CTGF*, (C) *Cyr61* e (D) *Birc5* por qRT-PCR. Os dados foram normalizados pela expressão do gene endógeno *GAPDH* e apresentados como expressão relativa a amostra controle com expressão proteica normal de *YAP*. As células YAP-KO<sup>A</sup> e YAP-KO<sup>B</sup> foram submetidas ao processo de CRISPR de *YAP*. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas biológicas e foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Na linhagem Daoy (Figura 7), os níveis transcricionais de *YAP* reduziram na ordem de 84% nas células CRISPR *YAP* (YAP-KO e YAP-KO + TAZ-KD) em relação às células controle (Figura 7A). Para o alvo de *YAP/TAZ CTGF*, observamos um aumento significativo de 80% na sua expressão nas células YAP-KO em relação às células controle e ausência de alteração da expressão gênica nas células YAP-KO + TAZ-KD (Figura 7B). Para as células Daoy YAP-KO e YAP-KO+TAZ-KD, a expressão

de CYR61 foi diminuída na ordem de 53-66% em relação às células controle (Figura 7C). Por fim, observamos um aumento não significativo de 32% na expressão de *Birc5* na célula YAP-KO e um aumento significativo de 69% na célula YAP-KO + TAZ-KD quando comparadas à célula controle (Figura 7D).

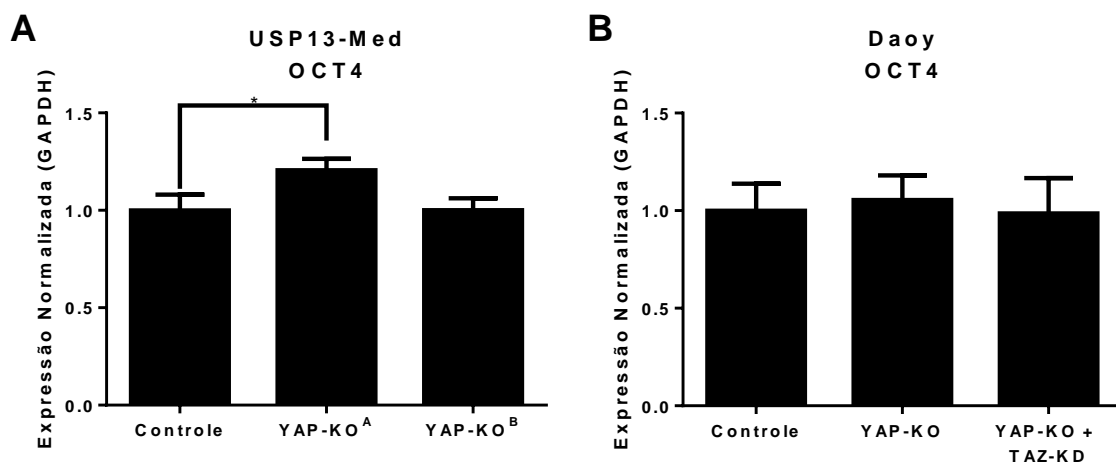


**Figura 7. Expressão de YAP, CTGF, Cyr61 e Birc5 em células de meduloblastoma Daoy controle e CRISPR para YAP.** Quantificação dos níveis transcricionais de (A) YAP, (B) CTGF, (C) *Cyr61* e (D) *Birc5* por qRT-PCR. Os dados foram normalizados pela expressão do gene endógeno *GAPDH* e apresentados como expressão relativa a amostra controle com expressão proteica normal de YAP. As células YAP-KO e YAP-KO+TAZ-KD foram submetidas ao processo de CRISPR de YAP e CRISPR de YAP com redução na expressão de TAZ, respectivamente. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas biológicas e foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Inicialmente, para explorar os efeitos do Knock-Out de YAP na expressão gênica de OCT4 nas linhagens USP13-Med e Daoy, avaliamos os níveis



transcricionais desse fator de transcrição por RT-qPCR (Figura 8). Na linhagem USP13-Med observamos um aumento de 20% na expressão de OCT4 na célula YAP-KO<sup>A</sup> e ausência de alteração na célula YAP-KO<sup>B</sup> em relação ao controle (Figura 8A). Complementarmente, os níveis gênicos expressos de OCT4 não foram alterados pelo CRISPR de YAP nas células Daoy YAP-KO e YAP-KO + TAZ-KD quando comparadas ao controle (Figura 8B).



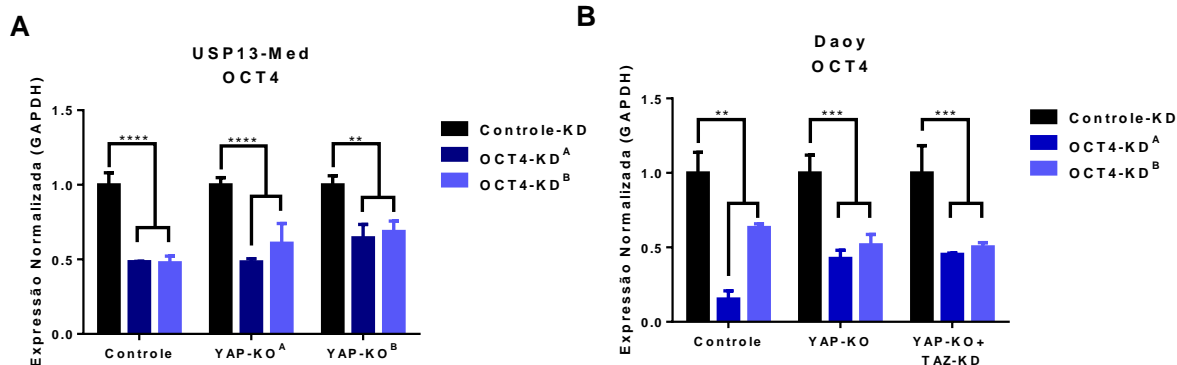
**Figura 8. Expressão de OCT4 em células de meduloblastoma.** Quantificação dos níveis transcricionais de OCT4 por qRT-PCR nas linhagens (A) USP13-Med e (B) Daoy. Os dados foram normalizados pela expressão do gene endógeno GAPDH e apresentados como expressão relativa a amostra controle com expressão proteica normal de YAP. As células YAP-KO<sup>A</sup>, YAP-KO<sup>B</sup>, YAP-KO e YAP-KO+TAZ-KD foram submetidas ao processo de CRISPR de YAP e CRISPR de YAP com redução na expressão de TAZ. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas biológicas e foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ .

Com estes dados, podemos concluir que temos um modelo validado de redução de expressão proteica de YAP em células de linhagens de meduloblastoma. Essa redução mimetiza o que ocorre nas células com o funcionamento normal da Via Hippo, que serve como uma inibidora da atividade de YAP/TAZ (Zhao *et al.*, 2012). Além disso, pudemos observar que a mudança na expressão de YAP não modificou

os níveis transcricionais de OCT4, que permaneceram equilibrados nas duas linhagens (Figura 8).

#### **4.2. Efeitos genéticos do silenciamento transitório de OCT4 em células de meduloblastoma com CRISPR para YAP**

Considerando a ausência de alteração dos níveis de OCT4 nas células CRISPR para YAP (Figura 8), optamos por explorar a relação de YAP e OCT4 através de ensaios de RT-qPCR após o uso de sequências de RNA de interferência (RNAi) para o silenciamento de OCT4 nas células USP13-Med Controle, YAP-KO<sup>A</sup> e YAP-KO<sup>B</sup>, além das células Daoy Controle, YAP-KO e YAP-KO + TAZ-KD. Para o Knock-Down (KD) de OCT4 nessas células foram utilizados três duplex de RNAi: um duplex controle (Controle-KD), e duas sequências para o silenciamento de OCT4 (OCT4-KD<sup>A</sup> e OCT4-KD<sup>B</sup>). Inicialmente validamos o silenciamento de OCT4 nas diferentes linhagens, observando uma diminuição significativa na expressão transcricional de OCT4 em ambas as linhagens de meduloblastoma e entre os diferentes duplex (Figura 9). Podemos observar que em todas as células testadas, os duplex OCT4-KD<sup>A</sup> e OCT4-KD<sup>B</sup> puderam silenciar em torno de 50-60% de expressão gênica de *OCT4*.

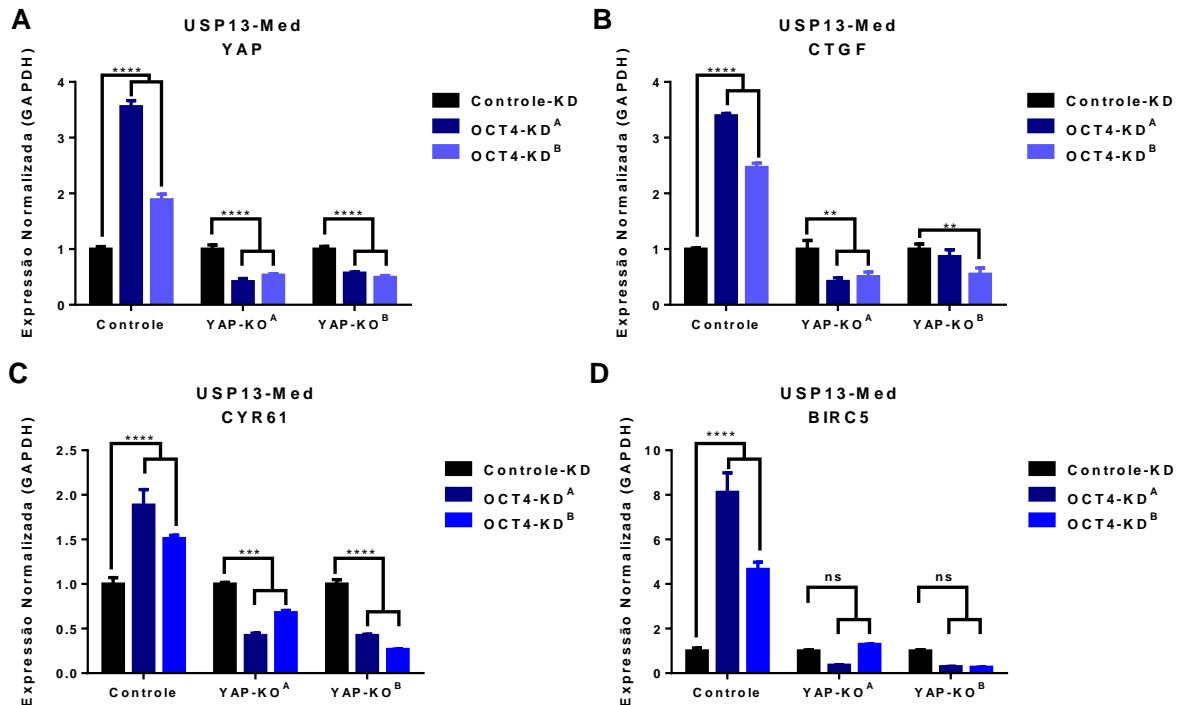


**Figura 9. Expressão de OCT4 em células de meduloblastoma após o silenciamento transitório específico.** Quantificação dos níveis transcricionais de *OCT4* por qRT-PCR. Os dados foram normalizados pela expressão do gene endógeno *GAPDH* e apresentados como expressão relativa a amostra duplex Controle-KD (barra preta) para cada clone diferente. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas biológicas e foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Considerando o sucesso no silenciamento de OCT4 após o RNAi, avaliamos o impacto do silenciamento transitório de OCT4 no status de ativação da via Hippo, por testes de qRT-PCR para *YAP* e seus genes alvo nas mesmas células transfectadas com os RNAi de OCT4.

Na linhagem USP13-Med (Figura 10), podemos observar que com o silenciamento de *OCT4*, os níveis transcricionais de *YAP* aumentaram significativamente (2-4x) nas células Controle (Figura 10A). Enquanto isso, nos clones YAP-KO<sup>A</sup> e YAP-KO<sup>B</sup> ocorre uma significativa redução de 50% na expressão transcricional de *YAP* (Figura 10A). De forma interessante, este padrão de expressão se mantém para os alvos *CTGF* e *Cyr61* (Figuras 10B-C), com um aumento significativo da expressão desses genes com o silenciamento de *OCT4* nas células Controle, e uma redução significativa nos clones YAP-KO<sup>A</sup> e YAP-KO<sup>B</sup> comparando as células transfectadas com duplex Controle-KD e as células transfectadas com

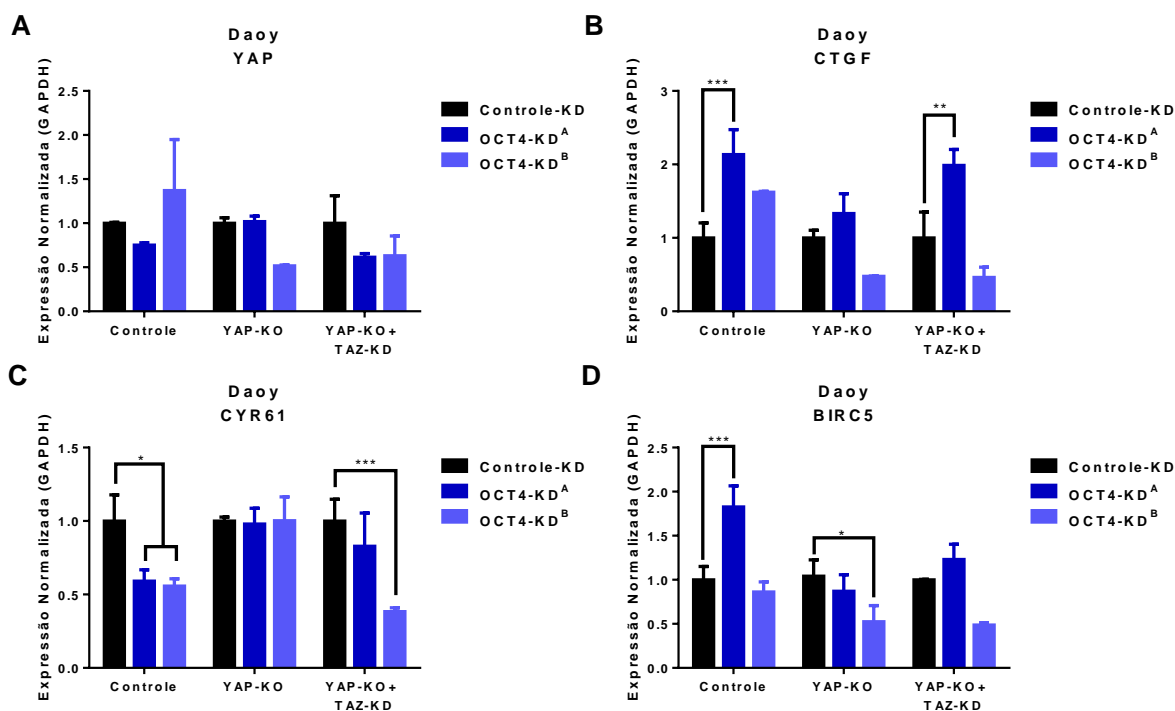
duplex OCT4-KD<sup>A</sup> e OCT4-KD<sup>B</sup>. Para o gene *Birc5*, observamos apenas o aumento de sua expressão nas células controle transfectadas com os duplex OCT4-KD<sup>A</sup> e OCT4-KD<sup>B</sup> (Figura 10D).



**Figura 10. Expressão de YAP e seus genes-alvo CTGF, Cyr61 e Birc5 em células USP13-Med com silenciamento transitório de OCT4.** Quantificação dos níveis transcricionais de (A) YAP, (B) CTGF, (C) Cyr61 e (D) Birc5 por RT-qPCR. Os dados foram normalizados pela expressão do gene endógeno GAPDH e apresentados como expressão relativa a amostra duplex Controle-KD (barra preta) para cada clone diferente. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas biológicas e foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Na linhagem Daoy (Figura 11), podemos observar diferenças com relação à linhagem USP13-Med. Primeiramente, com o silenciamento de OCT4, os níveis transcricionais de YAP não se alteraram significativamente em nenhum dos grupos experimentais quando transfectados com duplex Controle-KD ou com os duplex OCT4-KD<sup>A</sup> e OCT4-KD<sup>B</sup> (Figura 11A). Enquanto isso, no alvo de YAP, CTGF, podemos observar um padrão similar ao observado na linhagem USP13-Med para os

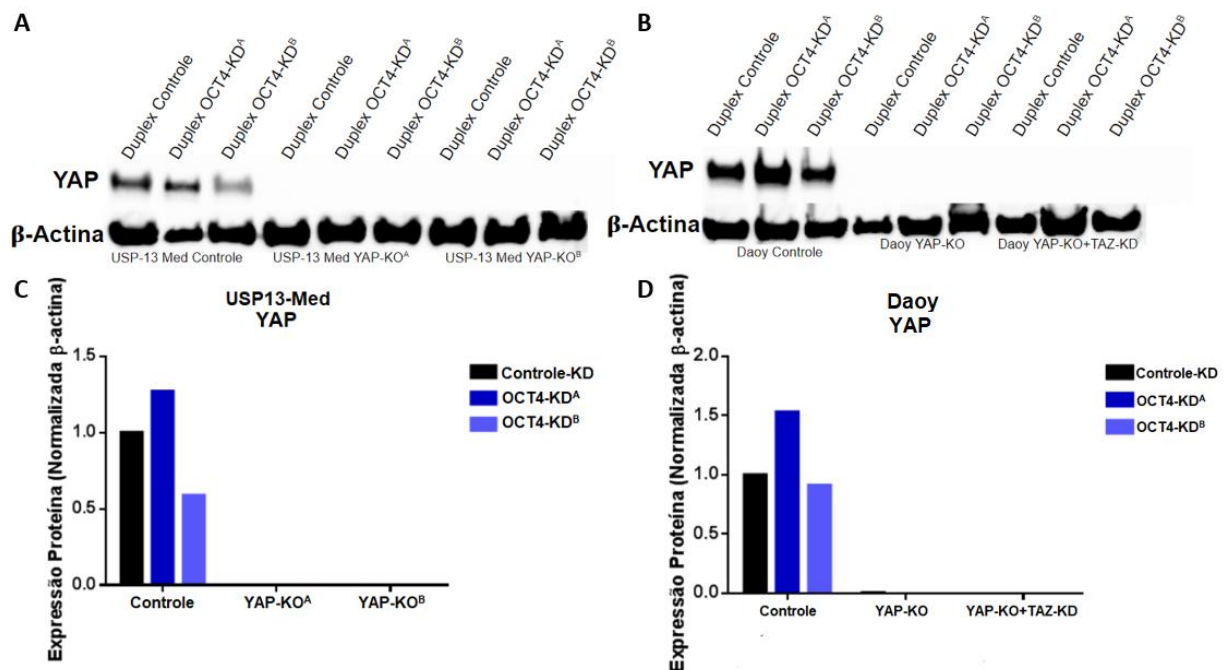
clones Controle, de um aumento significativo na expressão desses genes com o silenciamento por duplex OCT4-KD<sup>A</sup>, o mesmo duplex que causou a maior inibição de OCT4 nessa linhagem (Figura 11B). Ao contrário do observado na linhagem USP13-Med, porém, podemos ver um significativo aumento da expressão de *CTGF* no clone YAP-KO+TAZ-KD quando transfectado com o duplex OCT4-KD<sup>A</sup> (Figura 11B). Quanto à expressão de *Cyr61*, no clone Controle houve uma redução significativa desse gene com o silenciamento de *OCT4*, enquanto no clone YAP-KO não ocorreu nenhuma mudança significativa na expressão de *Cyr61* e no clone YAP-KO+TAZ-KD podemos observar uma redução significativa na sua expressão quando transfectado com o duplex OCT4-KD<sup>B</sup> (Figura 11C). Para o gene *Birc5*, assim como para o gene *CTGF*, observamos um padrão similar ao observado na linhagem USP13-Med para os clones Controle, de um aumento significativo na expressão desses genes com o silenciamento por duplex OCT4-KD<sup>A</sup> (Figura 11D), além de uma redução significativa de *Birc5* no clone YAP-KO transfectado com o duplex OCT4-KD<sup>B</sup> (Figura 11D).



**Figura 11. Expressão de YAP e seus genes-alvo CTGF, Cyr61 e Birc5 em células de Daoy após o silenciamento transitório de OCT4.** Quantificação dos níveis transcricionais de (A) YAP, (B) CTGF, (C) Cyr61 e (D) Birc5 por RT-qPCR. Os dados foram normalizados pela expressão do gene endógeno GAPDH e apresentados como expressão relativa a amostra duplex Controle-KD (barra preta) para cada clone diferente. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas biológicas e foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

A seguir, realizamos ensaios de Western Blot para observar a expressão proteica de OCT4 e YAP após o silenciamento de OCT4 nas células Daoy e USP13-Med com CRISPR para YAP. Na Figura 12 estão as duas membranas para detecção de YAP contendo as amostras de USP13-Med (Figura 13A) e Daoy (Figura 12B) após as transfecções com os duplex Controle, OCT4-KD<sup>A</sup> e OCT4-KD<sup>B</sup>. Na linhagem USP13-Med (Figura 12A) podemos observar que a proteína de YAP continua detectável apenas no clone Controle, que não é KO de YAP, e quando normalizamos pela  $\beta$ -actina, existe um leve aumento na expressão de YAP quando esta célula é tratada com o duplex OCT4-KD<sup>A</sup> (Figura 12C), congruente com o observado no aumento da expressão transcricional de YAP (Figura 10). Quando transfectada com

o duplex OCT4-KD<sup>B</sup>, no qual o aumento de expressão transcricional não foi tão elevado quanto, há uma diminuição na expressão proteica de YAP. Na linhagem Daoy (Figura 12B), por sua vez, também ainda só é observado YAP no clone Controle, e similarmente ocorre um aumento na expressão proteica de YAP quando transfectada com o duplex OCT4-KD<sup>A</sup>, e a expressão se mantém quando transfectado com o duplex OCT4-KD<sup>B</sup>. Diferentemente da linhagem USP13-Med, na Daoy não foi encontrada uma diferença significativa na expressão transcricional de YAP quando esse clone foi transfectado com os RNA de interferência (Figura 12C).

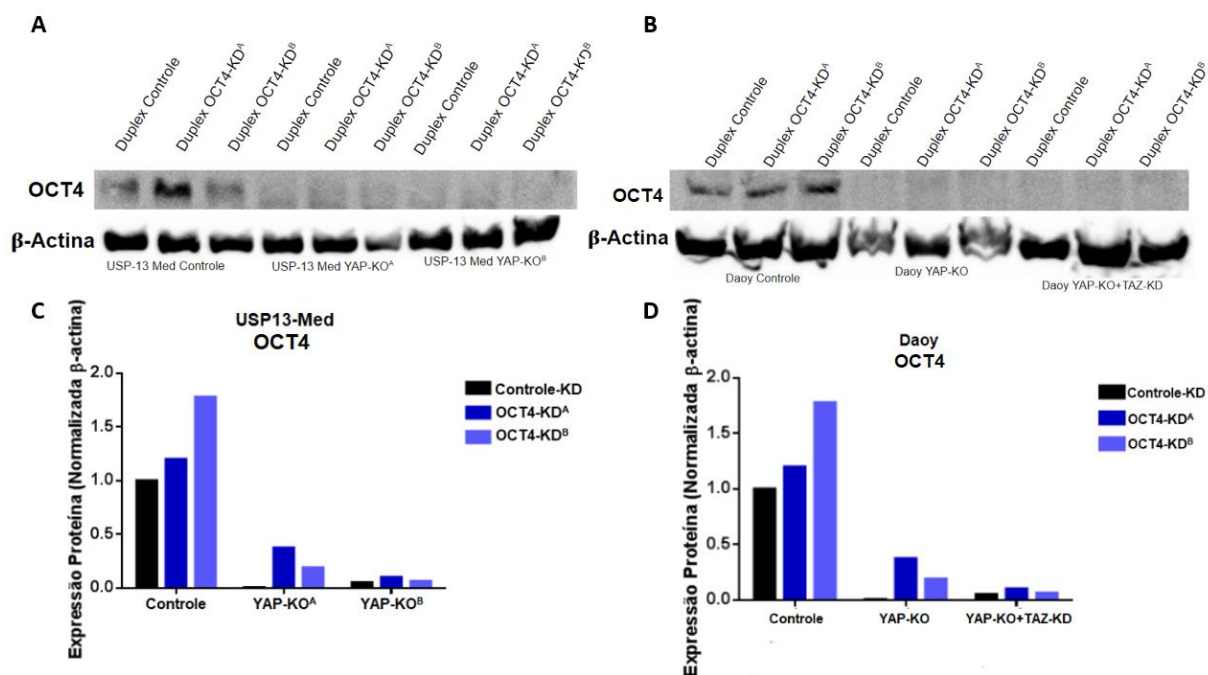


**Figura 12. Expressão proteica de YAP nas células Daoy e USP13-Med após o silenciamento transitório de OCT4.** Ensaio de Western Blot mostrando expressão proteica de YAP e controle endógeno β-actina nas linhagens (A) USP13-Med e (B) e Daoy. (C) Quantificação da expressão proteica de YAP na linhagem USP13-Med de uma replicata biológica. (D) Quantificação da expressão proteica de YAP na linhagem Daoy de uma replicata biológica.

Na Figura 13, avaliamos por Western Blot a expressão da proteína OCT4 na linhagem USP13-Med (Figura 13A). Não foi possível detectar OCT4A com anticorpo específico na membrana de USP13-Med, provavelmente devido à sua expressão

extremamente reduzida nessas células. Na linhagem USP13-Med podemos observar que a proteína de OCT4 é detectável apenas no clone Controle, que não é KO de YAP, e apesar de quando normalizamos a expressão dessa proteína pela  $\beta$ -actina existir um aumento na sua expressão quando transfectada com o duplex OCT4-KD<sup>A</sup> (Figura 13C), é preciso lembrar que a expressão dessa proteína é extremamente baixa, e por isso a confiança na quantificação da sua expressão diretamente por análise de brilho abaixa. Apesar disso, podemos visualizar que a expressão de OCT4 está restrita aos mesmos clones que apresentavam expressão proteica de YAP (Figura 13), a USP13-Med Controle. Já na linhagem Daoy avaliamos a expressão de OCT4, e de OCT4A observando o mesmo padrão de expressão que na linhagem USP13-Med: expressão de OCT4 e de sua isoforma OCT4A apenas nas células controle KO e ausência de sua expressão nas células com ausência de expressão proteica de YAP (Figura 13B e D).





**Figura 13. Expressão proteica de OCT4 nas células Daoy e USP13-Med após o silenciamento transitório de OCT4.** (A) Ensaio de Western Blot mostrando expressão proteica de OCT4 na linhagem USP13-Med, (B) de OCT4 na linhagem Daoy e controle endógeno  $\beta$ -actina nas linhagens. (C) Quantificação da expressão proteica de OCT4 na linhagem USP13-Med de uma replicata biológica. (D) Quantificação da expressão proteica de OCT4 na linhagem Daoy de uma replicata biológica.

A partir desses dados de análise de expressão gênica e proteica após o silenciamento de OCT4, podemos afirmar que nosso modelo de silenciamento de OCT4 com uso de RNA de interferência funcionou, como mostrado na queda de expressão de transcritos de OCT4 em todos os clones de ambas as linhagens depois das transfecções (Figura 9 A e B). Curiosamente, esse silenciamento transcricional não pareceu reduzir a expressão proteica de OCT4 (Figura 13 A-D), mas como mencionado anteriormente, a baixa expressão dessa proteína, e consequente baixa detecção, dificulta a normalização da expressão por brilho na membrana reduzindo a confiança nessas pequenas diferenças.

O mais interessante dos nossos achados foi de observar uma forte queda na expressão proteica de OCT4 nos clones que sofreram inibição de YAP (Figura 12A-

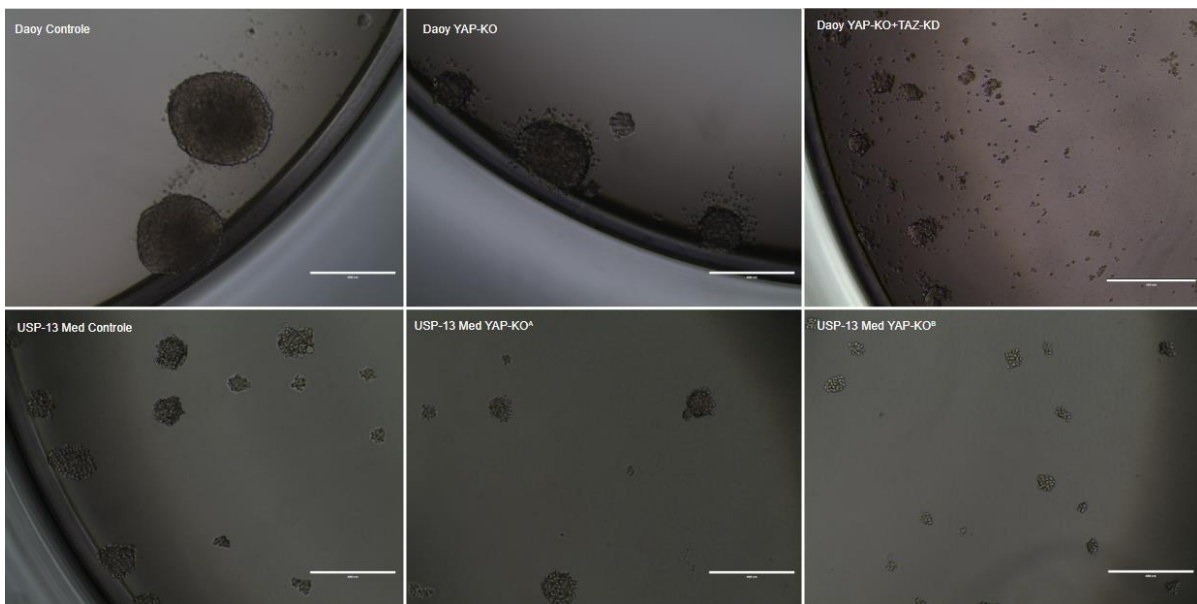
D e 13A-D), indicando uma possível dependência da expressão proteica de YAP para a regulação de OCT4 em células tumorais de meduloblastoma, ocorrendo nas duas linhagens estudadas (Figura 13 A-D). Outro dado interessante observado nos nossos resultados, foi que nos clones controle de USP13-Med, o silenciamento de OCT4 levou à um aumento significativo da expressão gênica de YAP que não ocorre nas linhagens YAP-KO (Figura 10A). Não só isso, os alvos de YAP também foram afetados da mesma forma, com *CTGF*, *Cyr61* e *Birc5* apresentando os mesmos padrões na variação de expressão, indicando uma possível inibição da ativação transcricional de YAP pela OCT4, e uma regulação de expressão entre esses dois fatores de transcrição na linhagem USP13-Med.

#### **4.3. Efeitos funcionais do silenciamento transitório de OCT4 em células de meduloblastoma com CRISPR para YAP**

Por fim, realizamos ensaios de geração de esferas tumorais, para avaliar os efeitos do silenciamento de *OCT4* na capacidade das células formarem esses aglomerados celulares, em clones com expressão normal de YAP, e em clones KO de YAP nas duas linhagens de meduloblastoma.

Primeiramente avaliamos a formação de esferas tumorais entre os clones Controle e YAP-KO das linhagens Daoy e USP13-Med para avaliar os efeitos da inibição de YAP isoladamente (Figuras 14-15). Houve uma marcada diferença no fenótipo das esferas Controle e YAP-KO principalmente na linhagem Daoy, com esferas Controle grandes e densas, e com formato bem definido circular, em contraste com esferas mais granulosas no clone YAP-KO, mais células soltas e esferas menores, indicando uma maior dificuldade na formação desses aglomerados na célula com nocaute de YAP. No clone YAP-KO+TAZ-KD essas características ficam

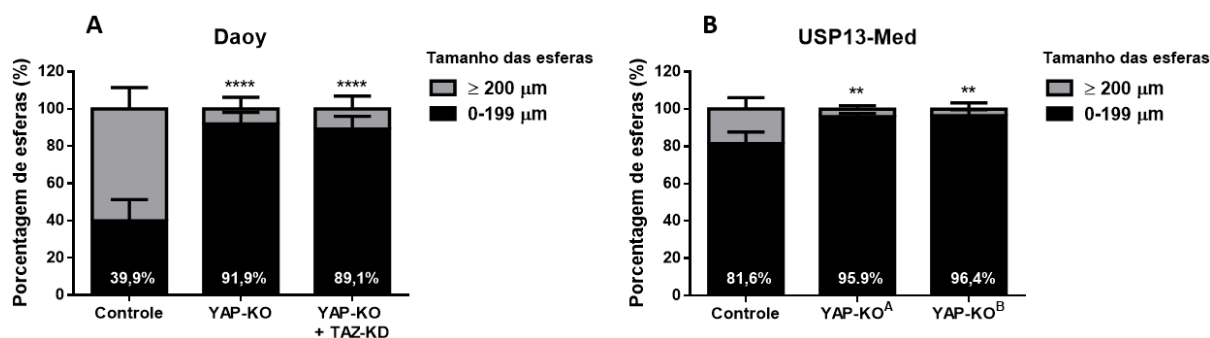
mais intensificadas, com esferas muito menores, bem mais irregulares e muitas células soltas, mostrando que além da inibição de YAP, a redução de TAZ também promoveu efeitos visíveis na capacidade de formação dessas esferas (Figura 14). Na linhagem USP13-Med também observamos que as esferas tumorais controle eram maiores que as esferas das células YAP-KO A e B (Figura 14).



**Figura 14. O KO de YAP diminui a formação de esferas tumorais em modelos celulares de meduloblastoma.** Esferas formadas ao longo de 4 dias nos clones Daoy Controle, YAP-KO e YAP-KO+TAZ-KD e USP13-Med Controle, YAP-KO<sup>A</sup> e YAP-KO<sup>B</sup>.

Na linhagem Daoy, o clone controle apresentou cerca de 60% de suas esferas com tamanho acima de 200  $\mu\text{m}$ , em comparação com os clones CRISPR que apresentaram apenas 8,1% e 10,9% respectivamente para YAP-KO e YAP-KO+TAZ-KD de esferas nessa faixa de tamanho (Figura 15A). Na linhagem USP13-Med, por sua vez, não ocorre uma diferença tão marcante, visto que mesmo as esferas Controle apresentam um tamanho reduzido quando comparadas as esferas de Daoy, e são mais similares entre a USP13-Med Controle e a YAP-KO<sup>A</sup> (Figura 14). Apesar disso as esferas Controle ainda são maiores do que as esferas com nocaute YAP,

com cerca de 18,4% das esferas maiores de 200  $\mu\text{m}$  em comparação com 4,1% e 3,6% respectivamente para as esferas dos clones YAP-KO<sup>A</sup> e YAP-KO<sup>B</sup> (Figura 15B).

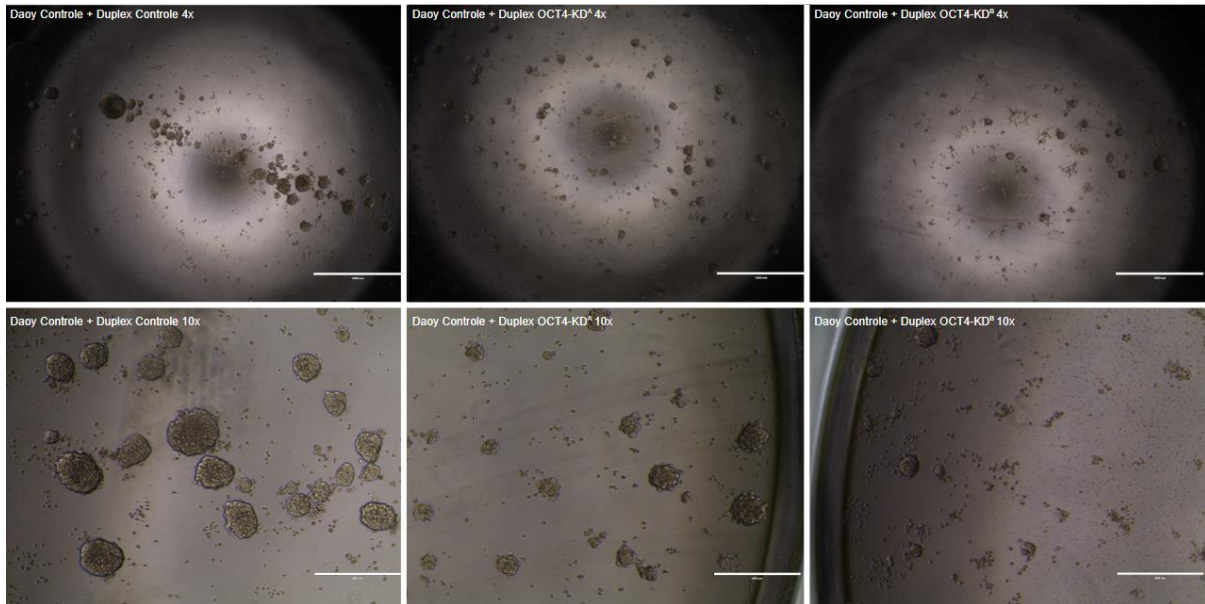


**Figura 15. YAP-KO diminui a proporção de esferas tumorais grandes em células Daoy e USP13-Med.** Gráficos indicando a proporção de tamanho das esferas nos clones com e sem CRISPR de YAP nas linhagens (A) Daoy e (B) USP13-Med. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas biológicas e foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

A seguir, foi realizado o ensaio de transfecção com os duplex para inibição de *OCT4*, para avaliar seu efeito na capacidade de formação dessas esferas com e sem expressão de YAP. Para a avaliação da capacidade de formação das esferas, as fotos foram processadas para contar o número total de esferas e o tamanho médio dessas esferas, visto que em trabalhos anteriores (Cortez *et al.*, 2023 – em preparação) observamos que uma maior dificuldade na formação dessas esferas pode resultar num aparente aumento no número total desses aglomerados, mas são muito menores e menos coesos, e na maioria das vezes apresentam um número menor de células total.

Primeiramente no clone Daoy Controle, é possível observar que as esferas com o duplex Controle-KD cresceram mais do que as esferas transfectadas com os duplex *OCT4*-KD<sup>A</sup> e *OCT4*-KD<sup>B</sup>, com fenótipo grande e bem definido (Figura 16). Em decorrência do processo de transfecção as esferas apresentam um maior número de

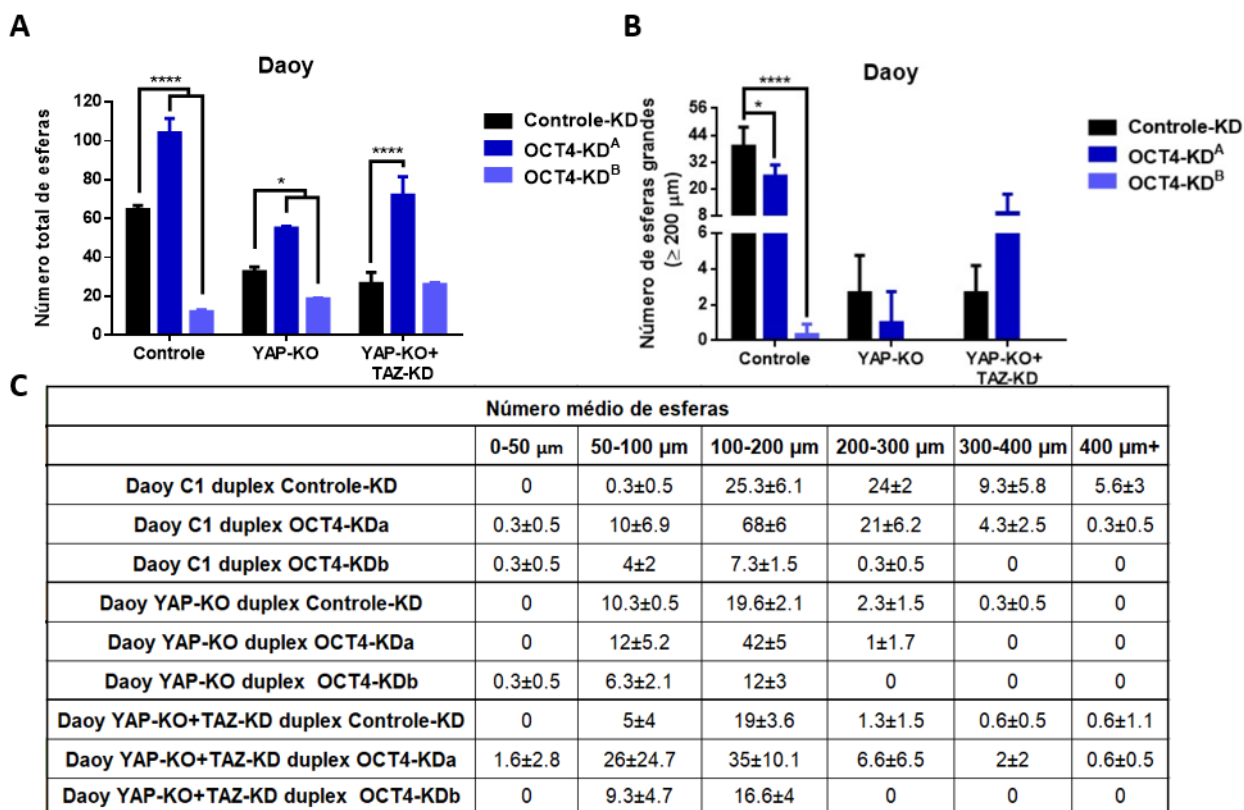
células mortas e não ficaram tão grandes e uniformes quanto as esferas geradas sem transfecção. Nas esferas transfectadas com RNA de interferência podemos ver uma forte diminuição no tamanho das esferas, tanto nas transfectadas com OCT4-KD<sup>A</sup> quanto com OCT4-KD<sup>B</sup> em relação à célula Controle-KD (Figuras 16 e 17).



**Figura 16. O silenciamento transitório de OCT4 forma esferas tumorais menos coesas em Daoy Controle.** Fotos ilustrativas tiradas das esferas de Daoy Controle nas três condições experimentais distintas. Esquerda, Duplex Controle-KD em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Meio, Duplex OCT4-KD<sup>A</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Direita, Duplex OCT4-KD<sup>B</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo).

Foram em média 24 esferas entre 200-300  $\mu\text{m}$  por poço para as esferas Controle-KD, em comparação com 21 nas transfectadas com OCT4-KD<sup>A</sup> e menos que 1 nas transfectadas com OCT4-KD<sup>B</sup> (Figura 17C). Essa diferença se aprofunda quando olhamos para as esferas maiores, que não foram observadas no grupo transfectado com OCT4-KD<sup>B</sup>, e que foram representadas em média por 9 esferas por poço entre 300-400  $\mu\text{m}$  e 6 acima de 400  $\mu\text{m}$  nas esferas Controle-KD, em comparação com 4 e 1 respectivamente nas esferas transfectadas com OCT4-KD<sup>A</sup>.

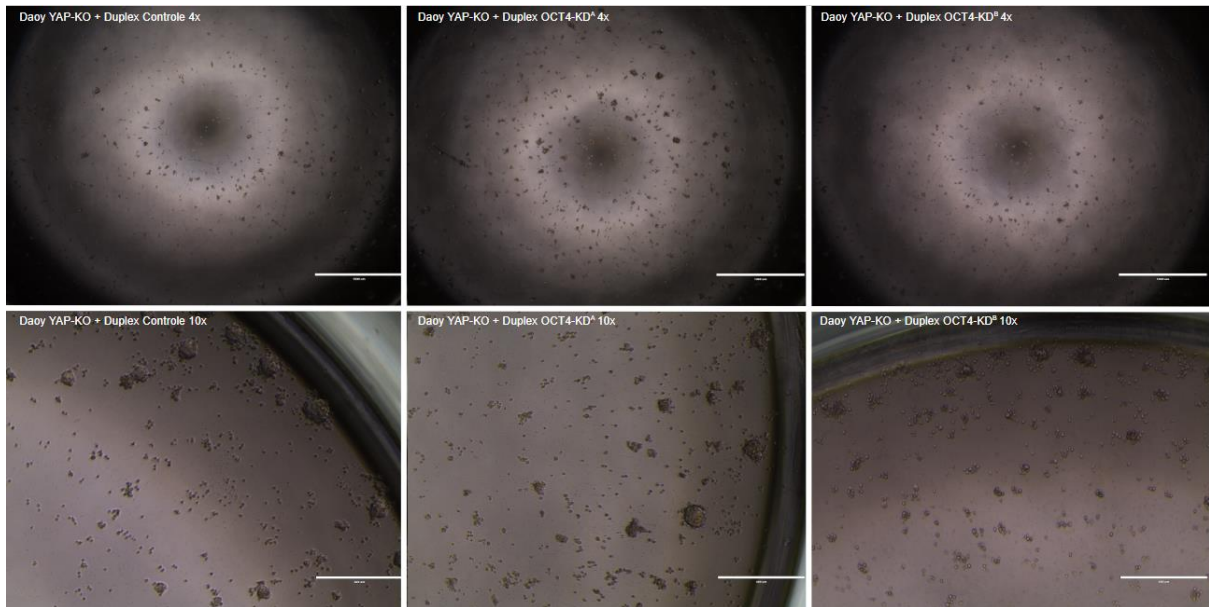
No caso das transfectadas com OCT4-KD<sup>A</sup>, podemos ver um aumento no número total de esferas (Figura 17A) mas que são menores e menos densas, e uma redução significativa no número de esferas grandes (Figura 17B) indicando menor proliferação celular, capacidade de autorrenovação e maior dificuldade em formar esferas coesas. As esferas transfectadas com OCT4-KD<sup>B</sup> apresentaram maior dificuldade de formação, e tiveram seu número total reduzido (Figura 17A). De forma interessante, o padrão observado entre as esferas transfectadas com duplex Controle-KD e com inibição de OCT4 (i.e., diminuição das esferas após o silenciamento) é similar ao observado entre o clone Controle e os clones YAP-KO (Figura 14).



**Figura 17. O silenciamento de OCT4 leva a uma diminuição da formação de esferas tumorais grandes em Daoy.** (A) Gráfico mostrando número total de esferas, (B) Gráfico mostrando número total de esferas grandes (>200 μm) e (C) Tabela com as quantidades médias de esferas por poço em cada intervalo de tamanho nos clones da linhagem Daoy transfectados com os três duplex; Controle-KD, OCT4-KD<sup>A</sup> e OCT4-KD<sup>B</sup>. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão de triplicatas biológicas e foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. \* p < 0,05; \*\*\*\* p < 0,0001.

No clone YAP-KO da linhagem Daoy as células foram mais afetadas pela transfecção, mas não foi possível observar uma diferença significativa na capacidade de formação de esferas apenas entre as esferas transfectadas com duplex Controle-KD e as transfectadas com duplex OCT4-KD<sup>B</sup> (Figura 18). As esferas transfectadas com duplex Controle-KD formaram menos esferas no total (Figura 17A), mas apresentaram um número médio de esferas acima de 200 μm muito similar às transfectadas com o duplex OCT4-KD<sup>A</sup> (Figura 17B, C), com cerca de 2 esferas por poço. Nas esferas transfectadas com OCT4-KD<sup>B</sup> o número total de esferas caiu significativamente, e não foram observadas esferas maiores do que 200 μm. É interessante de observar que o padrão médio de tamanho das esferas KO-YAP é bem

parecido com o padrão observado nas esferas Controle que sofreram silenciamento de OCT4 (Figura 17). E a diferença no número total de esferas entre as que tiveram ou não silenciamento de OCT4 pode ser devido à uma maior toxicidade dos RNAi, que leva a uma maior fragmentação das esferas.

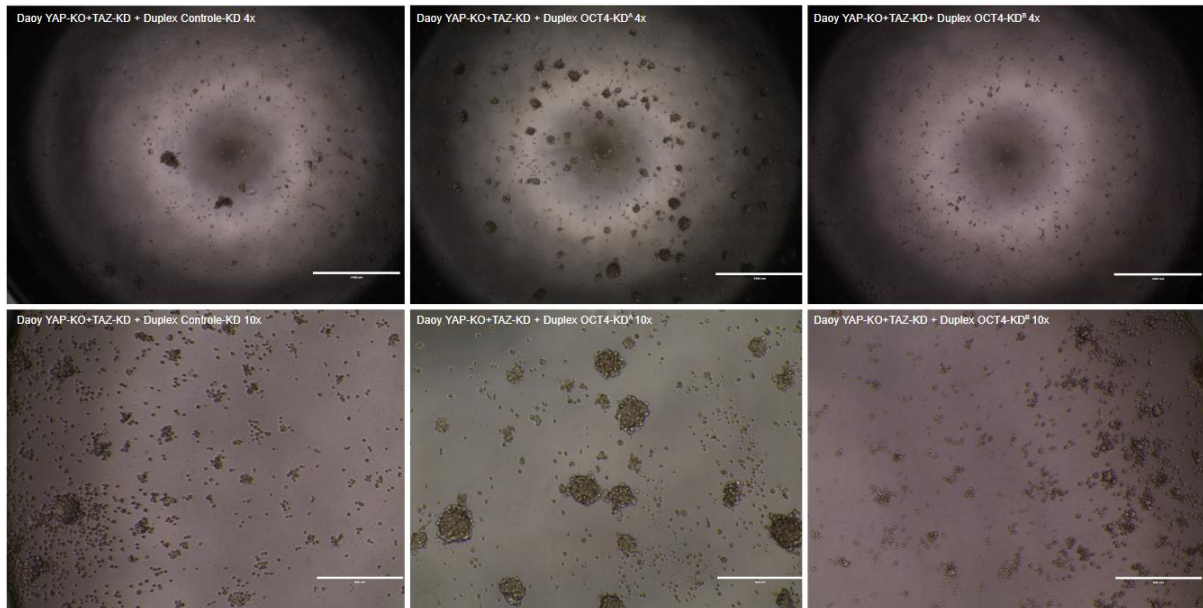


**Figura 18. O silenciamento transitório de OCT4 forma esferas tumorais menos coesas em Daoy YAP-KO.** Fotos ilustrativas tiradas das esferas de Daoy YAP-KO nas três condições experimentais distintas. Esquerda, Duplex Controle-KD em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Meio, Duplex OCT4-KD<sup>A</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Direita, Duplex OCT4-KD<sup>B</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo).

Para finalizar a linhagem Daoy, o clone YAP-KO+TAZ-KD também apresentou uma maior formação de esferas quando transfectado com o Duplex OCT4-KD<sup>A</sup> (Figura 19, em número total de esferas (Figura 17A), tendo cerca de 3x mais esferas do que nos grupos transfectados com duplex Controle-KD e OCT4-KD<sup>B</sup>. Quanto ao tamanho médio das esferas, também não foi observada uma diferença significativa entre os grupos que tiveram ou não silenciamento de OCT4 (Figura 17B-C), e o padrão se assemelha muito ao observado nas esferas Controle silenciadas com



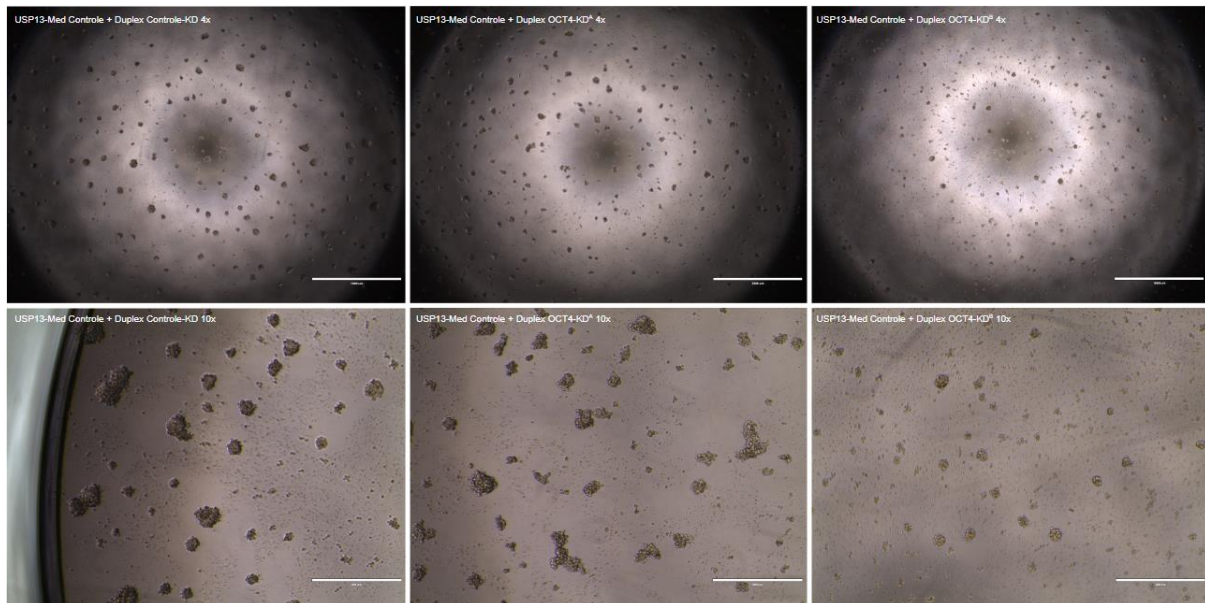
OCT4, indicando que o efeito observado nas esferas de menor capacidade de renovação poderia ser regulado por YAP através de OCT4.



**Figura 19. O silenciamento transitório de OCT4 forma esferas tumorais menos coesas em Daoy YAP-KO+TAZ-KD.** Fotos ilustrativas tiradas das esferas de Daoy YAP-KO+TAZ-KD nas três condições experimentais distintas. Esquerda, Duplex Controle-KD em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Meio, Duplex OCT4-KD<sup>A</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Direita, Duplex OCT4-KD<sup>B</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo).

Esse ensaio também foi realizado na linhagem USP13-Med, na qual os clones Controle também não apresentaram mudanças significativas com a transfecção do duplex Controle-KD (Figura 20), com um fenótipo similar ao observado nas esferas controle sem transfecção (Figura 14), mas é possível observar um maior número de células mortas em decorrência do próprio processo de transfecção que pode diminuir a viabilidade das células. Nas esferas transfectadas com duplex OCT4-KD<sup>A</sup> e OCT4-KD<sup>B</sup> as esferas são menores e menos coesas (Figura 23C), e especialmente no grupo transfectado com OCT4-KD<sup>B</sup> é possível ver em detalhe no aumento maior (Figura 20), que as esferas ficaram menores do que nos outros dois grupos, e com mais células mortas. Quanto comparamos o número médio de esferas grandes nessa linhagem

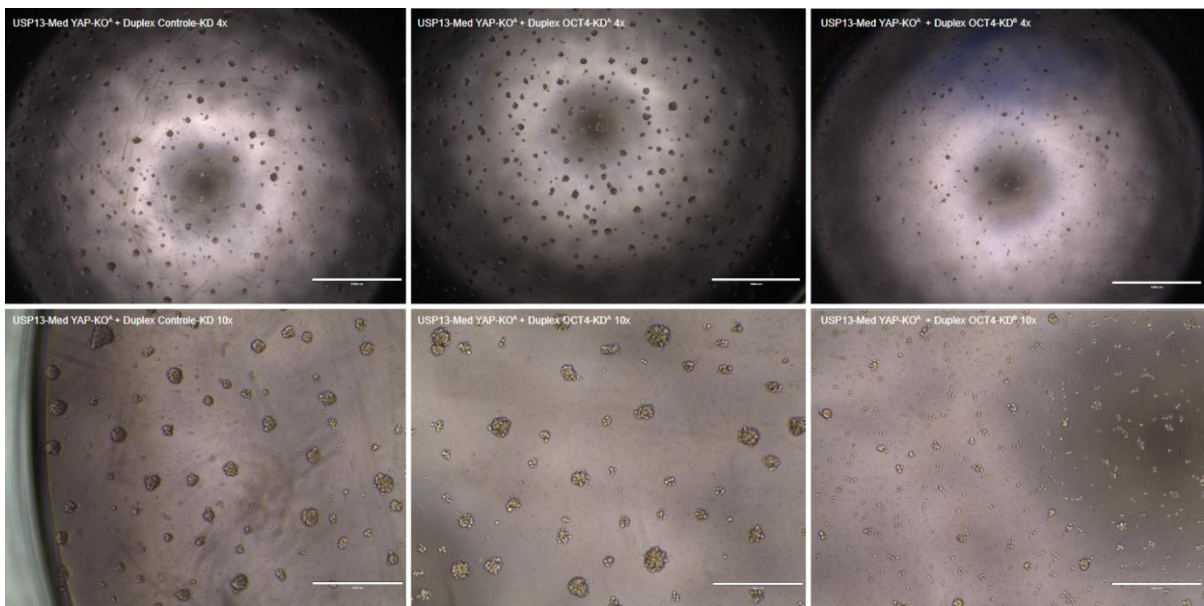
(Figura 23B), vemos que também ocorre uma redução significativa nas esferas Controle quando é feito um silenciamento de OCT4, de cerca de 16 esferas acima de 200  $\mu\text{m}$  no grupo sem silenciamento, para em torno de 2 esferas nos grupos silenciados.



**Figura 20. O silenciamento transitório de OCT4 forma esferas tumorais menos coesas em USP13-Med controle.** Fotos ilustrativas tiradas das esferas de USP13-Med Controle nas três condições experimentais distintas. Esquerda, Duplex Controle-KD em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Meio, Duplex OCT4-KD<sup>A</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Direita, Duplex OCT4-KD<sup>B</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo).

No clone YAP-KO<sup>A</sup>, o grupo transfectado com duplex Controle-KD não apresentou mudanças no seu fenótipo com a transfecção (Figura 21). Visualmente não é possível distinguir os grupos transfectados com duplex Controle-KD e com OCT4-KD<sup>A</sup>, com esferas de tamanho e coesão similares. Enquanto isso, no grupo transfectado com OCT4-KD<sup>B</sup> as células parecem ter tido maior dificuldade de formação de esferas, com mais células mortas, e esferas significativamente menores e menos coesas do que nos outros dois grupos (Figura 21). Ao compararmos os

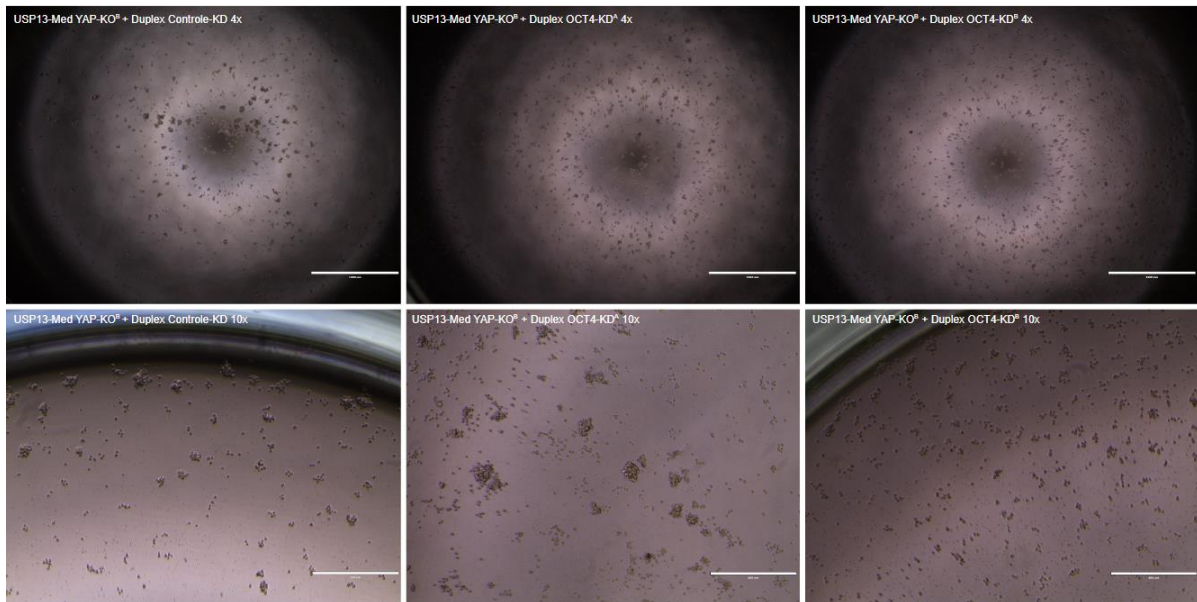
tamanhos médios dessas esferas, podemos ver que, apesar de ocorrer um aumento no número total de esferas (Figura 23A), a capacidade de formação de esferas grandes não sofre mudanças significativas (Figura 23B), similarmente ao observado na linhagem Daoy (Figura 17). Novamente, como vimos que a inibição de YAP levou à uma redução na expressão de OCT4, os efeitos observados no número total de esferas com o silenciamento podem ser resultado de uma toxicidade no processo de transfecção com os RNAi, fragilizando as esferas e causando uma maior fragmentação e maior número de esferas.



**Figura 21. O silenciamento transitório de OCT4 forma esferas tumorais menos coesas em USP13-Med YAP-KO<sup>A</sup>.** Fotos ilustrativas tiradas das esferas de USP13-Med YAP-KO<sup>A</sup> nas três condições experimentais distintas. Esquerda, Duplex Controle-KD em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Meio, Duplex OCT4-KD<sup>A</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Direita, Duplex OCT4-KD<sup>B</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo).

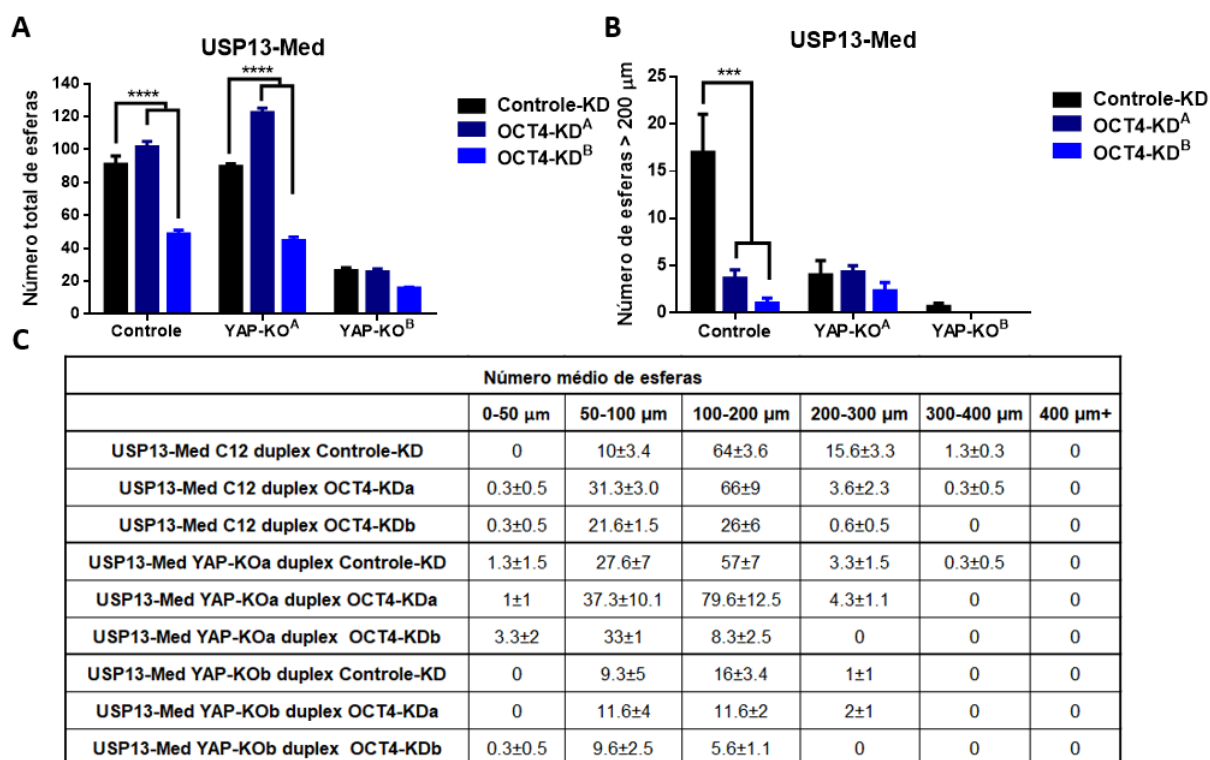
O clone YAP-KO<sup>B</sup>, por sua vez, sofreu mais com a transfecção (Figura 22), podendo ser observado numa visão geral do poço que existem muito mais células soltas e mortas quando comparadas ao clone sem transfecção (Figura 14). Apesar disso, o tamanho das esferas continua similar, sendo o clone que gera as menores

esferas entre os três. Novamente, os grupos tratados com duplex Controle-KD e OCT4-KD<sup>A</sup> são muito similares no formato e coesão das esferas, enquanto que o grupo tratado com OCT4-KD<sup>B</sup> apresentou muitas células soltas e maior dificuldade de formação desses aglomerados (Figura 22).



**Figura 22. O silenciamento transitório de OCT4 forma esferas tumorais menos coesas em USP13-Med YAP-KO<sup>B</sup>.** Fotos ilustrativas tiradas das esferas de USP13-Med YAP-KO<sup>B</sup> nas três condições experimentais distintas. Esquerda, Duplex Controle-KD em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Meio, Duplex OCT4-KD<sup>A</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo). Direita, Duplex OCT4-KD<sup>B</sup> em aumento de 4x (acima) e 10x (abaixo).

Quanto ao número total de esferas por poço, não foram observadas diferenças significativas no número total de esferas entre as diferentes transfecções para o clone YAP-KO<sup>B</sup> (Figura 23A), nem nas para as esferas grandes (Figura 23B) e podemos observar padrões de tamanho muito similares entre as diferentes transfecções (Figura 23C)



**Figura 23. O silenciamento de OCT4 leva a uma diminuição da formação de esferas tumorais grandes em USP13-Med.** (A) Gráfico mostrando número total de esferas, (B) Gráfico mostrando número total de esferas grandes (>200 μm) e (C) Tabela com as quantidades médias de esferas por poço em cada intervalo de tamanho nos clones da linhagem USP13-Med transfectados com os três duplex; Controle-KD, OCT4-KD<sup>A</sup> e OCT4-KD<sup>B</sup>. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão de triplicatas biológicas e foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.

No clone USP13-Med Controle, apesar de ter uma média de número total de esferas por poço no grupo transfectado com duplex Controle-KD menor do que no grupo transfectado com duplex OCT4-KD<sup>A</sup>, a média de tamanho dessas esferas é maior (Figura 23C). A média de número de esferas no intervalo de tamanho de 200-300 μm no grupo Controle-KD foi de 15,6 esferas por poço, em comparação com as apenas 3,6 esferas por poço no grupo OCT4-KD<sup>A</sup>, mesmo apresentando esferas em média menores do que as esferas de Daoy (Figura 17B). Ainda, foi possível observar poucas esferas no intervalo de 300-400 μm, predominantemente no grupo

transfectado com Controle-KD, com em média pelo menos uma por poço (Figura 23C).

Os clones USP13-Med YAP-KO<sup>A</sup> e YAP-KO<sup>B</sup> tiveram um padrão de média de tamanhos entre os grupos Controle-KD e OCT4-KD<sup>A</sup> muito parecido, o que era esperado após a visualização inicial dos poços (Figura 21), e considerando que como foi observada uma redução na expressão proteica de OCT4 com a inibição de YAP, o silenciamento não teria um efeito muito marcante nesses clones. Para o clone YAP-KO<sup>A</sup>, a maior parte das esferas em ambos os grupos está no intervalo de tamanho de 100-200  $\mu\text{m}$  (cerca de 65% do total de esferas para ambas), enquanto no intervalo de 200-300  $\mu\text{m}$  o grupo tratado com OCT4-KD<sup>A</sup> tem uma média de 4,3 esferas por poço, em comparação com 3,3 esferas para o grupo Controle-KD, que foi o único grupo de transfecção desse clone que foi possível observar esferas maiores de 300  $\mu\text{m}$  (Figura 23C). O grupo transfectado com OCT4-KD<sup>B</sup> teve um padrão diferente, com a grande maioria das suas esferas apresentando tamanho médio entre 50-100  $\mu\text{m}$  (em média 33 por poço em comparação a 8,3 no intervalo de 100-200  $\mu\text{m}$ ), e nenhuma esfera com tamanho acima de 200  $\mu\text{m}$  (Figura 23C).

No clone USP13-Med YAP-KO<sup>B</sup> a média de tamanho entre os grupos Controle-KD e OCT4-KD<sup>A</sup>, assim como no clone USP13-Med YAP-KO<sup>A</sup>, foi similar (Figura 23C). No caso do clone YAP-KO<sup>B</sup>, o grupo transfectado com duplex Controle-KD gerou mais esferas no intervalo de 100-200  $\mu\text{m}$  (em média 16 por poço), seguido de em média 9 por poço no intervalo de 50-100  $\mu\text{m}$  e apenas 1 acima de 200  $\mu\text{m}$ . Para o grupo transfectado com duplex OCT4-KD<sup>A</sup> essa proporção ficou mais equilibrada, com o número de esferas nos intervalos de 50-100  $\mu\text{m}$  e 100-200  $\mu\text{m}$  sendo igual (11,6 esferas por poço em ambos os intervalos) e apenas 2 acima de 200  $\mu\text{m}$  (Figura 23C). No grupo transfectado com OCT4-KD<sup>B</sup>, a maior média de número de esferas

por poço novamente se deslocou para o intervalo de 50-100  $\mu\text{m}$  (9,6 por poço) enquanto que no intervalo de 100-200  $\mu\text{m}$  era possível observar apenas 5,6 esferas em média por poço. Nenhum dos grupos transfectados de USP13-Med YAP-KO<sup>B</sup> gerou esferas maiores do que 300  $\mu\text{m}$  (Figura 23C).

A partir dos dados obtidos com as esferas tumorais, podemos concluir que a inibição de YAP por CRISPR nas linhagens de meduloblastoma teve um efeito similar ao observado nas nossas análises prévias por inibição farmacológica (Cortez *et al.*, 2023 – em preparação), com as esferas apresentando mudança no seu fenótipo com a inibição de YAP, se tornando menores e menos densas indicando menor proliferação celular, e menor coesão entre as células para formar aglomerados maiores, e mais importante, menor capacidade de autorrenovação, uma das características marcantes do enriquecimento de células-tronco tumorais na população celular, que ocorre no ensaio de formação de esferas (Figuras 17 e 23), principalmente na linhagem Daoy. Um dado interessante que pode ser observado é que o efeito do silenciamento de OCT4 nos clones controle, com expressão normal de YAP, foi similar ao efeito de inibição de YAP entre os clones diferentes. Na linhagem Daoy, por exemplo, as esferas Controle com duplex Controle-KD apresentaram uma média de 22% de esferas com tamanho acima de 300  $\mu\text{m}$ , em comparação com 4% nas esferas Controle com duplex OCT4-KD<sup>A</sup> e 0 com OCT4-KD<sup>B</sup>. Além disso, a maioria das esferas no grupo Controle-KD está equilibrada entre os tamanhos 100-200  $\mu\text{m}$  e 200-300  $\mu\text{m}$ , com cerca de 38% em cada, e este número desloca para mais de 60% no intervalo de 100-200  $\mu\text{m}$  nas esferas transfectadas com RNAi. Esse desvio é observado nos clones com inibição de YAP, que também apresentam 1% e 5% de esferas acima de 300  $\mu\text{m}$  (YAP-KO e YAP-KO+TAZ-KD, respectivamente), além de 60% e 71% respectivamente para o intervalo de 100-200

$\mu\text{m}$  (Figura 17B). Na USP13-Med, ocorre uma forte queda na quantidade de esferas acima de 200  $\mu\text{m}$  tanto com o silenciamento de OCT4, quanto com a inibição de YAP, de cerca de 17% na Controle, para 1-4%. Apesar da maior parte das esferas estar no intervalo de 100-200  $\mu\text{m}$  em todas as condições, ocorre um aumento considerável na quantidade de esferas no intervalo de 50-100  $\mu\text{m}$ , de 10% nas esferas Controle, para 30-40% nas esferas silenciadas e KO-YAP (Figura 23C).

Por fim, esse efeito significativo do silenciamento de OCT4 na capacidade de formação de esferas nos clones Controle não foi observado nas esferas KO-YAP, devido ao fato de que a própria inibição de YAP já havia causado uma redução na expressão proteica de OCT4 (Figura 13). Nos grupos de tamanho acima de 200  $\mu\text{m}$ , o número médio de esferas entre os poços não apresentou diferenças significativas entre as transfecções (Figura 17B e 23B). Isso nos dá uma possível indicação inicial de que os efeitos observados na capacidade de formação de esferas, pela inibição de YAP, podem ser decorrentes da sua consequente redução proteica de OCT4. Os grupos transfectados com OCT4-KD<sup>B</sup> apresentaram em geral menor número de esferas e tamanhos menores em todos os grupos (Figura 17 e 23), o que pode ser decorrente da forma como ocorre a inibição de OCT4 com esse duplex.



## 5. Discussão

### 5.1. Via Hippo e YAP no estudo de câncer

O interesse sobre a Via Hippo começou no início dos anos 2000, com trabalhos em drosófila apontando um papel de seu efetor final, Yorkie, na regulação do tamanho de órgãos (Huang *et al.*, 2005, Edgar, 2006, Pan, 2007). Logo em seguida, Dong e colaboradores demonstraram em seu trabalho que uma desregulação da Via Hippo, com subsequente maior expressão de YAP/TAZ, não só levava à uma hiperplasia de órgãos em drosófila e mamíferos, mas quando mantida, essa desregulação poderia levar ao desenvolvimento de tumores (Dong *et al.*, 2007), apresentando esses fatores como possíveis proto-oncogenes. Além disso, apesar de sua importante função no desenvolvimento de órgãos e alta expressão em células-tronco (Camargo *et al.*, 2007), foi observado que YAP/TAZ parecem dispensáveis para a homeostase normal das células adultas, exibindo baixa expressão nestas células até o surgimento de um trauma que induz reparo em algum tecido danificado, elevando a expressão desses fatores (Zanconato *et al.*, 2016). O interesse sobre a Via Hippo e sua relação com tumores cresceu quando a função de YAP, em conjunto com seu co-regulador transcricional, TAZ foi elucidada como um potente fator de transcrição. Essa função é exercida com auxílio dos fatores da família TEAD, que possuem sítios de ligação com o DNA, e sem os quais YAP e TAZ não conseguem executar suas funções como fatores de transcrição (Galli *et al.*, 2015, Stein *et al.*, 2015, Zanconato *et al.*, 2015).

Investigando as funções de YAP e TAZ no desenvolvimento de tumores, podemos ver sua relação com diversos dos chamados *Hallmarks* de Câncer (Hanahan e Weinberg, 2011). A expressão exacerbada destes fatores está diretamente associada com uma proliferação celular descontrolada, como já visto nos primeiros estudos associando sua função à regulação de crescimento de órgãos

(Overholtzer *et al.*, 2006, Camargo *et al.*, 2007, Dong *et al.*, 2007, Chan *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2007). Outra função que pode ser atrelada ao trabalho de Hanahan e Weinberg é a de aumento na resistência à morte celular, já que o aumento da expressão de YAP/TAZ, assim como a de alguns de seus alvos de transcrição, foi associada à resistência a morte programada (Zhao *et al.*, 2012). Outro *Hallmark* também associado às células tumorais, é o de indução de angiogênese; e um dos efeitos de seus alvos, *CTGF* e *Cyr61*, é justamente o de induzir a formação de novos vasos sanguíneos no microambiente tumoral (Brigstock, 2002).

Mais recentemente, a relação de YAP e TAZ com a formação e manutenção das células-tronco tumorais levou a discussão acerca da importância do estudo desses fatores a outros patamares. Descritas em tumores sólidos pela primeira vez no início dos anos 2000 (Al-Hajj *et al.*, 2003, Gilbertson *et al.*, 2007), essas células são de suma importância para o desenvolvimento de novas terapias e abordagens no estudo de desenvolvimento de tumores por serem células capazes de repovoar o ambiente tumoral, estarem relacionadas a uma maior agressividade tumoral e com o surgimento de metástases, este último sendo outra característica definitiva de células tumorais (Hanahan e Weinberg, 2011). Além disso, sua capacidade de autorrenovação e elevado potencial de diferenciação faz com que tumores com populações de células-tronco tumorais sejam mais complexos de se tratar (Yu *et al.*, 2012, Ayob *et al.*, 2018, Chang, 2016). Em um trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo (Cortez *et al.*, 2023 – em preparação), realizamos a inibição farmacológica de YAP usando um composto chamado *Visudyne* (comercialmente conhecido como Verteporfina), e observamos um efeito significativo da inibição de YAP na capacidade das células tumorais em formarem esferas tumorais, que, como mencionado anteriormente, são aglomerados celulares enriquecidos com marcadores

de células-tronco. No presente trabalho, observamos novamente o efeito dessa inibição sobre a formação de esferas tumorais, mas em clones com inibição de YAP por edição gênica, que também resultou em um crescimento menos uniforme desses aglomerados celulares em relação aos clones Controle com expressão normal de YAP (Figura 14), apresentando um maior número de esferas menores e menos coesas (Figura 17 e 22).

Devido ao papel conhecido da expressão de YAP/TAZ em células-tronco embrionárias, na manutenção de fenótipo tronco em células tumorais e evidências atrelando sua expressão com a indução de um fenótipo progenitor em células diferenciadas, consideramos fundamental explorar mais a fundo a interação destes com outros fatores de transcrição, como o OCT4, que já é descrito há muito tempo como um importante marcador de pluripotência (Palmieri *et al.*, 1994). O OCT4 foi um dos quatro genes manipulados na geração original das primeiras células-tronco pluripotentes induzidas (Takahashi e Yamanaka, 2006) e a queda de sua expressão está diretamente associada a diferenciação celular (Shi e Jin, 2010), além de ter sua maior expressão atrelada a um pior prognóstico em pacientes de meduloblastoma, sendo responsável por aumentar a agressividade desses tumores (Rodini *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2017).

## **5.2. Uma possível regulação entre OCT4 e YAP em células tumorais**

A ideia de focar na possível relação entre OCT4 e YAP foi motivada pelo número crescente de estudos solidificando o papel do YAP como um fator envolvido na geração e manutenção de um estado progenitor/desdiferenciado das células. Lian e colaboradores demonstraram que a expressão de YAP está diretamente associada

ao destino das células, com células-tronco embrionárias perdendo expressão de YAP durante a diferenciação (Lian *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que a superexpressão de YAP em células-tronco embrionárias mantidas em condições para diferenciação foi capaz de sustentar a pluripotência dessas células, que mantiveram a expressão proteica de OCT4 e Sox2, em contraste com as células controle que se diferenciaram normalmente e tiveram a expressão destes mesmos fatores reduzida. Por fim, os autores mostraram também que durante a reprogramação de células-tronco pluripotentes induzidas, a expressão de YAP era significativamente mais alta nas células reprogramadas do que nos fibroblastos parentais que as geraram (Lian *et al.*, 2010). Em nosso trabalho, um dos resultados mais interessantes foi o de comparação da expressão proteica de OCT4 em duas linhagens de meduloblastoma com clones controle e CRISPR-YAP, mostrando que nessas células tumorais, a detecção de OCT4 é apenas visível nos clones com expressão proteica normal de YAP (Figura 13 e 14), o que é congruente com os resultados obtidos em células embrionárias (Lian *et al.*, 2010). Além disso, a queda na expressão proteica de OCT4 não foi acompanhada de uma queda na sua expressão gênica (Figura 9), como esperado originalmente. Esses resultados sugerem que o mecanismo que pode estar operando entre a inibição de YAP e a redução na expressão proteica de OCT4 seja o de uma regulação pós-transcricional ou traducional.

É interessante observar essa relação acontecendo em células tumorais, uma vez que já é bem definida a função de OCT4 como um marcador de pluripotência. O fato de sua expressão proteica possivelmente estar atrelada à expressão de YAP agrega para o conhecimento de como esses dois fatores podem interagir para a formação de células-tronco tumorais, contribuindo para a agressividade de meduloblastoma, especialmente nos dois grupos dos modelos estudados: SHH

(Daoy) e grupo 3/ 4 (USP13-Med), que são os dois grupos mais agressivos dessa doença (Schwalbe *et al.*, 2017). Vale ressaltar que mesmo valores consideravelmente baixos de expressão de OCT4 em tumores, especificamente a isoforma OCT4A, são considerados indicadores de pior prognóstico para pacientes (De Resende *et al.*, 2013).

Em 2008, Varelas e colaboradores exploraram a importância de TAZ para a regulação da autorrenovação em células-tronco embrionárias humanas. Foi demonstrado que TAZ, com a estimulação da via do TGF $\beta$ , auxilia a ligação dos complexos Smad 2/3-4, contribuindo no seu transporte para o núcleo e consequente manutenção dos marcadores de autorrenovação. Quando TAZ é silenciado, essas células perdem a capacidade de se autorrenovar e começam um processo de diferenciação (Varelas *et al.*, 2008). Esse mecanismo envolvendo TAZ, porém, era independente de OCT4, visto que sua expressão proteica não foi afetada pelo silenciamento de TAZ. No presente trabalho nós focamos no YAP, o fator de transcrição mais estudado da Via Hippo e que possui uma correlação conhecida com o OCT4., uma vez que possuíamos um modelo de clones tumorais que passaram pelo processo de CRISPR. Entretanto, ressaltamos a importância de explorar também a atividade de TAZ em estudos futuros, por já existirem muitas evidências associando sua expressão independente com a manutenção do fenótipo tronco em células embrionárias e progenitoras.

Outro trabalho encontrou que alguns dos efeitos de YAP em tumores de pulmão eram mediados pela regulação da expressão de Sox2 por via de uma ligação física entre OCT4 e YAP em seu domínio WW (Bora-Singhal *et al.*, 2015), que é o mesmo domínio pelo qual YAP se liga a TAZ. Neste trabalho não avaliamos diretamente essa interação entre os dois fatores, entretanto, foi observado que na

formação de esferas tumorais, a consequência de realizar apenas o silenciamento de OCT4, ou apenas a inibição de YAP, foi muito similar (Figura 18B e Figura 24B). A média de tamanho com qualquer uma dessas condições foi reduzida, com um aumento no número de esferas pequenas, e uma redução no número de esferas maiores. Além disso, o efeito do silenciamento de OCT4 com o duplex OCT4-KD<sup>A</sup> em clones que já estavam com YAP inibido não foi tão significativo quanto nos clones com expressão normal de YAP, o que pode indicar que, com a desregulação da Via Hippo, os efeitos observados com a expressão anormal de YAP são resultado de uma ação conjunta com OCT4 para enriquecimento de marcadores de células-tronco e na formação de esferas tumorais. Um indício desse resultado é de que OCT4, parece ter uma influência significativa no fenótipo das esferas, visto que sua inibição em células com expressão normal de YAP teve consequências similares às de células que tiveram inibição de YAP, e consequente redução nos níveis proteicos de OCT4. Seria necessário, porém, conseguir um modelo com células apresentando superexpressão de OCT4 em células KO-YAP e verificar sua capacidade de formação de esferas para conseguir delimitar melhor a interação entre esses dois fatores de transcrição.

O resultado obtido com o duplex OCT4-KD<sup>B</sup> foi o que mais nos intrigou, pois apesar de não parecer afetar tanto a expressão gênica de OCT4, quando comparado ao duplex OCT4-KD<sup>A</sup> (Figura 10), na maioria dos casos a transfecção com esse duplex levou a uma menor expressão dos genes estudados, menor número total de esferas formadas, e menor tamanho médio dessas esferas, parecendo afetar significativamente a capacidade proliferativa das células tumorais testadas. Isso pode estar relacionado à uma diferença na forma de inibição de OCT4 por esse duplex em específico, que pode afetar diferentemente as isoformas. Esses resultados evidenciam a complexidade no estudo de OCT4, e a dificuldade em discernir as

funções de suas isoformas. Devido a essa dificuldade, optamos por utilizar primers e anticorpos tanto para OCT4, quanto para OCT4A, aproveitando que a isoforma OCT4A é a única que apresenta o exon 1 em seu transcrito. Mesmo utilizando primers e anticorpos específicos para OCT4A, este fator de transcrição se mostrou de difícil detecção nas metodologias de PCR e Western Blot devido à sua baixa expressão em células mais diferenciadas. Nós conseguimos detectar a expressão proteica de OCT4A apenas na linhagem Daoy, o que é interessante considerando que esta linhagem apresenta uma expressão basal de YAP maior do que a USP13-Med, em decorrência de ser um subtipo de meduloblastoma diretamente associado com desregulações da Via Hippo. Esse resultado pode indicar uma associação entre YAP e OCT4A e seria interessante para estudos futuros com técnicas de detecção mais específicas para cada uma das isoformas.

No presente trabalho também foi possível observar uma interação curiosa; na linhagem USP13-Med, o silenciamento de OCT4 levou a um aumento da expressão transcricional de YAP apenas no clone com expressão proteica normal de YAP, enquanto nos clones KO-YAP, a sua expressão gênica foi reduzida. Além disso, todos os genes-alvo de YAP (*CTGF*, *Cyr61* e *Birc5*) tiveram o mesmo padrão de expressão, o que pode indicar uma regulação transcricional de YAP por OCT4 nessas células. Sabendo-se que os níveis proteicos de OCT4 caem na ausência da proteína de YAP, e que ocorre um aumento na expressão gênica de YAP em resposta ao silenciamento de OCT4, podemos sugerir que para a linhagem de USP13-Med, o YAP estaria envolvido de alguma forma na regulação da expressão de OCT4. Sendo assim, a superexpressão transcricional de YAP seria uma forma da célula manter a expressão de OCT4. Esse controle, porém, teria que ser dependente da expressão proteica de YAP, visto que nos clones KO-YAP a expressão transcricional de YAP e seus alvos é

reduzida (Figura 11). Essa regulação não ocorreu na linhagem Daoy, mas vale ressaltar que, apesar de serem duas linhagens de meduloblastoma, elas apresentam origens e desenvolvimento diferentes, o que acarreta num perfil genético distinto. Dessa forma, nem todas as interações e resultados que são observados em uma das linhagens serão observados na outra. A Daoy é uma linhagem decorrente de meduloblastoma tipo SHH, com maior expressão de YAP, e reduzida expressão de TP53 (Ivanov *et al.*, 2016). Já a USP13-Med, é uma linhagem de meduloblastoma tipo 3/4, com modificações genéticas diferentes (Silva *et al.*, 2015).

Seria muito interessante realizar ensaios de superexpressão de YAP nas células YAP-KO, para tentar resgatar sua expressão proteica e avaliar os efeitos sobre a expressão de OCT4, que caso fosse resgatada também, reforçaria uma possível regulação entre esses dois fatores que são fundamentais para a regulação do fenótipo tronco. Originalmente tentamos gerar um modelo de superexpressão condicional de YAP nas células YAP-KO, por indução por doxiciclina, mas tivemos dificuldades em manter as células com os vetores de superexpressão, fazendo com que fosse necessária a adoção de um modelo mais simples para a conclusão do projeto em tempo hábil. Outro modelo que ajudaria a elucidar a relação entre OCT4 e YAP, especialmente levando em conta os resultados que obtivemos em esferas, seria o de uma superexpressão de OCT4 em células KO-YAP, para então verificar a capacidade na formação de esferas. Seria interessante comparar os resultados obtidos com esse outro modelo com os dados obtidos neste trabalho, que mostraram que o silenciamento de OCT4 em células com expressão normal de YAP resulta em efeitos similares na capacidade de proliferação e autorrenovação de esferas tumorais do que a inibição de YAP, com consequente redução na expressão de OCT4.



Em suma, apesar de ainda serem necessárias análises mais específicas juntamente com análises de outros envolvidos nessa comunicação, nossos resultados demonstram que: em ambas as linhagens Daoy e USP13-Med a redução da expressão proteica, mas não gênica de OCT4, parece estar diretamente associada a expressão de YAP, sendo apenas detectada em clones que não tiveram *knockout* de YAP por CRISPR. Além disso, o efeito do silenciamento de OCT4 sobre a formação de esferas tumorais em ambas as linhagens foi muito similar ao efeito por inibição de YAP, de modo que o silenciamento de OCT4 nos clones com inibição de YAP não mudou significativamente o fenótipo destas células, mostrando que ambos os fatores parecem estar diretamente ligados com a agressividade tumoral, mas que a princípio podem agir em conjunto para induzir o fenótipo tronco mais agressivo. Um efeito restrito à linhagem USP13-Med, porém muito interessante, foi o de aumento na expressão transcricional de YAP e seus alvos apenas no clone controle com o silenciamento de OCT4, em conjunto com o resultado de redução na expressão proteica de OCT4 quando YAP é inibido, esse resultado pode indicar que nessa linhagem ocorre uma regulação pós-transcricional ou traducional de OCT4 dependente de YAP.

## 6. Conclusões

Levando em consideração os objetivos iniciais que nos propomos a alcançar com o desenvolvimento deste projeto, podemos concluir que:

1. Nas linhagens de meduloblastoma humano Daoy e USP13-Med, quando submetidas a inibição de expressão de YAP por CRISPR, não foi observada uma redução significativa na expressão transcricional de OCT4. No entanto, os níveis proteicos desse fator foram significativamente afetados, sendo reduzidos em todas as células sem expressão de YAP.
2. Na linhagem de meduloblastoma humano USP13-Med, o silenciamento de OCT4 por pequeno RNA de interferência, levou à um aumento na expressão transcricional de YAP e de seus genes-alvo nos clones controle, o que não foi observado nos clones com inibição de expressão de YAP.
3. Nas linhagens de meduloblastoma humano Daoy e USP13-Med, foi observada uma redução na capacidade de formação, proliferação e autorrenovação de esferas tumorais após o silenciamento de OCT4, indicada pela redução no número de esferas grandes, e maior fragmentação em esferas menores. Este efeito foi o mesmo que o observado com a inibição de YAP por CRISPR nos clones estudados.

## 7. Referências

ABTA. **American Brain Tumor Association.** [s.l: s.n.]

AL-HAJJ, Muhammad e colab. **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 100, n. 7, p. 3983–3988, 10 Mar 2003.

AYOB, Ain Zubaidah e RAMASAMY, Thamil Selvee. **Cancer stem cells as key drivers of tumour progression.** Journal of Biomedical Science, v. 25, n. 1, 6 Mar 2018.

BAILEY, Percival e CUSHING, Harvey. **Microchemical Color Reactions as an Aid to the Identification and Classification of Brain Tumors.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 11, n. 1, p. 82–84, Jan 1925.

BASU-ROY, Upal e colab. **Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells.** Nature Communications, v. 6, n. 1, 2 Abr 2015.

BLOM, Ingrid E e GOLDSCHMEDING, Roel e LEASK, Andrew. **Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy?** Matrix Biology, v. 21, n. 6, p. 473–482, Out 2002.

BOIDOT, Romain e VÉGRAN, Frédérique e LIZARD-NACOL, Sarab. **Transcriptional regulation of the survivin gene.** Molecular Biology Reports, v. 41, n. 1, p. 233–240, 7 Nov 2013.

BORA-SINGHAL, Namrata e colab. **YAP1 Regulates OCT4 Activity and SOX2 Expression to Facilitate Self-Renewal and Vascular Mimicry of Stem-Like Cells.** Stem Cells, v. 33, n. 6, p. 1705–1718, 21 Maio 2015.

BRIGSTOCK. **Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61).** Angiogenesis, v. 5, n. 3, p. 153–165, [S.d.].

CAMARGO, Fernando D. e colab. **YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells.** Current Biology, v. 17, n. 23, p. 2094, Dez 2007.

CAO, Xinwei e PFAFF, Samuel L. e GAGE, Fred H. **YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor.** Genes & Development, v. 22, n. 23, p. 3320–3334, 17 Nov 2008.

CHAN, Siew Wee e colab. **A Role for TAZ in Migration, Invasion, and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells.** Cancer Research, v. 68, n. 8, p. 2592–2598, 15 Abr 2008.

- CHANG, Jenny C. **Cancer stem cells**. *Medicine*, v. 95, n. 1S, p. S20–S25, Set 2016.
- DE RESENDE, Marina França e colab. **Prognostication of OCT4 isoform expression in prostate cancer**. *Tumor Biology*, v. 34, n. 5, p. 2665–2673, 1 Maio 2013.
- DESHMUKH, Sachin K. **Role of the Gut Microbiome in the Modulation of Cancer Immunotherapy Response**. *Archives of Cancer Biology and Therapy*, n. 3, 31 Dez 2020. Acesso em: 15 jan 2023.
- DONG, Jixin e colab. **Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in Drosophila and Mammals**. *Cell*, v. 130, n. 6, p. 1120–1133, Set 2007.
- DONG, Zhongyi e colab. **Increased expression of OCT4 is associated with low differentiation and tumor recurrence in human hepatocellular carcinoma**. *Pathology - Research and Practice*, v. 208, n. 9, p. 527–533, Set 2012.
- DZUTSEV, Amiran e colab. **Microbes and Cancer**. *Annual Review of Immunology*, v. 35, n. 1, p. 199–228, 26 Abr 2017.
- EDGAR, Bruce A. **From Cell Structure to Transcription: Hippo Forges a New Path**. *Cell*, v. 124, n. 2, p. 267–273, Jan 2006.
- ELLISON, David W. e colab. **Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups**. *Acta Neuropathologica*, v. 121, n. 3, p. 381–396, 26 Jan 2011.
- FOULADI, Maryam e colab. **Intellectual and Functional Outcome of Children 3 Years Old or Younger Who Have CNS Malignancies**. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 28, p. 7152–7160, 1 Out 2005.
- GALLI, Giorgio G. e colab. **YAP Drives Growth by Controlling Transcriptional Pause Release from Dynamic Enhancers**. *Molecular Cell*, v. 60, n. 2, p. 328–337, Out 2015.
- GILBERTSON, Richard J. e RICH, Jeremy N. **Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche**. *Nature Reviews Cancer*, v. 7, n. 10, p. 733–736, Out 2007.
- HALDER, Georg e CAMARGO, Fernando D. **The Hippo Tumor Suppressor Network: From Organ Size Control to Stem Cells and Cancer**. *Cancer Research*, v. 73, n. 21, p. 6389–6392, 31 Out 2013.
- HAN, Ji-Soo e colab. **Regulation of Cyr61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways. Role of CREB and AP-1 transcription factors**. *European Journal of Biochemistry*, v. 270, n. 16, p. 3408–3421, Ago 2003.

HANAHAN, Douglas e WEINBERG, Robert A. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation**. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, Mar 2011.

HANAHAN, Douglas. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions**. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 Jan 2022.

HARVEY, Kieran F. e ZHANG, Xiaomeng e THOMAS, David M. **The Hippo pathway and human cancer**. *Nature Reviews Cancer*, v. 13, n. 4, p. 246–257, 7 Mar 2013.

HELMINK, Beth A. e colab. **The microbiome, cancer, and cancer therapy**. *Nature Medicine*, v. 25, n. 3, p. 377–388, Mar 2019.

HIEMER, Samantha E. e SZYMANIAK, Aleksander D. e VARELAS, Xaralabos. **The Transcriptional Regulators TAZ and YAP Direct Transforming Growth Factor  $\beta$ -induced Tumorigenic Phenotypes in Breast Cancer Cells**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 19, p. 13461–13474, Maio 2014.

HOPPE-HIRSCH, E. e colab. **Intellectual outcome in children with malignant tumors of the posterior fossa: influence of the field of irradiation and quality of surgery**. *Child's Nervous System*, v. 11, n. 6, p. 340–345, Jun 1995.

JAENISCH, Rudolf e YOUNG, Richard. **Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming**. *Cell*, v. 132, n. 4, p. 567–582, Fev 2008.

JERABEK, Stepan e colab. **OCT4: Dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1839, n. 3, p. 138–154, Mar 2014.

JOHNSON, Randy e HALDER, Georg. **The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment**. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 13, n. 1, p. 63–79, 13 Dez 2013.

KELLNER e KIKYO, **Histol Histopathol, Vol 25**. Disponível em: <[http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol\\_25/25\\_3/25\\_3\\_405.htm](http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_25/25_3/25_3_405.htm)>.

KILTIE, A.E. e LASHFORD, L.S. e GATTAMANENI, H.R. **Survival and late effects in medulloblastoma patients treated with craniospinal irradiation under three years old**. *Medical and Pediatric Oncology*, v. 28, n. 5, p. 348–354, Maio 1997.

KONDOFF, Slavomir e colab. **A case of early extraneural medulloblastoma metastases in a young adult**. *Asian Journal of Neurosurgery*, v. 10, n. 04, p. 331–333, Dez 2015. Acesso em: 11 jan 2023.

KOTOULA, Vassiliki e PAPAMICHOS, Spyros I. e LAMBROPOULOS, Alexandros F. **Revisiting OCT4 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells**. *Stem Cells*, v. 26, n. 1, p. 290–291, 11 Out 2007.

KOWALD, Axel e PASSOS, João F. e KIRKWOOD, Thomas B. L. **On the evolution of cellular senescence**. *Aging Cell*, v. 19, n. 12, 9 Nov 2020.

LAPIDOT, Tsvee e colab. **A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice**. *Nature*, v. 367, n. 6464, p. 645–648, Fev 1994.

LEE, Bongyong e colab. **Medulloblastoma cerebrospinal fluid reveals metabolites and lipids indicative of hypoxia and cancer-specific RNAs**. *Acta Neuropathologica Communications*, v. 10, n. 1, 24 Fev 2022.

LEE, Soyoung e SCHMITT, Clemens A. **The dynamic nature of senescence in cancer**. *Nature Cell Biology*, v. 21, n. 1, p. 94–101, Jan 2019.

LETO, K., Arancillo, M., Becker, E.B.E. e colab. **Consensus Paper: Cerebellar Development**. *Cerebellum* 15, 789–828 (2016).

LIAN, Ian e colab. **The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation**. *Genes & Development*, v. 24, n. 11, p. 1106–1118, 1 Jun 2010.

LIEDTKE, Stefanie e STEPHAN, Milaid e KÖGLER, Gesine. **Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research**. *bchm*, v. 389, n. 7, p. 845–850, 6 Jun 2008.

LOUIS, David N. e colab. **The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system**. *Acta Neuropathologica*, v. 114, n. 5, p. 547–547, 28 Set 2007.

MIZRAK, D e BRITTAN, M e ALISON, Mr. **CD133: molecule of the moment**. *The Journal of Pathology*, v. 214, n. 1, p. 3–9, 7 Dez 2007.

MONFERRER, Ezequiel e colab. **High Oct4 expression: implications in the pathogenesis of neuroblastic tumours**. *BMC Cancer*, v. 19, n. 1, 3 Jan 2019.

MUOIO, V M F e colab. **Extraneural metastases in medulloblastoma**. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 69, n. 2b, p. 328–331, 2011.

NGUYEN, Tam D. e colab. **Female Sex Hormones Activate Human Endogenous Retrovirus Type K Through the OCT4 Transcription Factor in T47D Breast Cancer Cells**. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 35, n. 3, p. 348–356, Mar 2019.

NORTHCOTT, Paul A. e colab. **Medulloblastomics: the end of the beginning**. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 12, p. 818–834, 23 Nov 2012. OSTROM, Quinn T e colab. **CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017**. *Neuro-Oncology*, v. 22, n. Supplement\_1, p. iv1–iv96, Out 2020.

OVERHOLTZER, Michael e colab. **Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 103, n. 33, p. 12405–12410, 15 Ago 2006.

PALMIERI, Susan L. e colab. **Oct-4 Transcription Factor Is Differentially Expressed in the Mouse Embryo during Establishment of the First Two Extraembryonic Cell Lineages Involved in Implantation.** Developmental Biology, v. 166, n. 1, p. 259–267, Nov 1994.

PAN, Duoqia. **Hippo signaling in organ size control.** Genes & Development, v. 21, n. 8, p. 886–897, 15 Abr 2007.

PANOSYAN, Eduard H. e colab. **Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation.** Pediatric Blood & Cancer, v. 55, n. 4, p. 644–651, 29 Jun 2010.

QIN, Han e colab. **Transcriptional analysis of pluripotency reveals the Hippo pathway as a barrier to reprogramming.** Human Molecular Genetics, v. 21, n. 9, p. 2054–2067, 27 Jan 2012.

RODINI, Carolina Oliveira e colab. **Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma.** Journal of Neuro-Oncology, v. 106, n. 1, p. 71–79, 2 Jul 2011.

SCHWALBE, Edward C e colab. **Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study.** The Lancet Oncology, v. 18, n. 7, p. 958–971, Jul 2017. Acesso em: 5 jan 2023.

SEO, Eunjeong e colab. **SOX2 Regulates YAP1 to Maintain Stemness and Determine Cell Fate in the Osteo-Adipo Lineage.** Cell Reports, v. 3, n. 6, p. 2075–2087, Jun 2013.

SHI, Guilai e JIN, Ying. **Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency.** Stem Cell Research & Therapy, v. 1, n. 5, Dez 2010.

SILVA, Patrícia Benites Gonçalves Da e colab. **Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells.** Cytotechnology, v. 68, n. 4, p. 1545–1560, 10 Set 2015.

SILVA, Patrícia Benites Gonçalves Da e colab. **High OCT4A levels drive tumorigenicity and metastatic potential of medulloblastoma cells.** Oncotarget, v. 8, n. 12, p. 19192–19204, 7 Fev 2017.

SINGH, Sheila K. e colab. **Identification of human brain tumour initiating cells.** Nature, v. 432, n. 7015, p. 396–401, Nov 2004.

STEIN, Claudia e colab. **YAP1 Exerts Its Transcriptional Control via TEAD-Mediated Activation of Enhancers.** PLOS Genetics, v. 11, n. 8, p. e1005465, 21 Ago 2015.

TAMM, Christoffer e BÖWER, Nathalie e ANNERÉN, Cecilia. **Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes–YAP–TEAD2 signaling pathway downstream of LIF.** Development, v. 138, n. 8, p. e1–e1, 15 Abr 2011.

UCHIDA, Nobuko e colab. **Direct isolation of human central nervous system stem cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 97, n. 26, p. 14720–14725, 19 Dez 2000.

VARELAS, Xaralabos e colab. **TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal.** Nature Cell Biology, v. 10, n. 7, p. 837–848, 22 Jun 2008.

VENUGOPAL, Chitra e colab. **Bmi1 marks intermediate precursors during differentiation of human brain tumor initiating cells.** Stem Cell Research, v. 8, n. 2, p. 141–153, Mar 2012.

VISVADER, Jane E. e LINDEMAN, Geoffrey J. **Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions.** Nature Reviews Cancer, v. 8, n. 10, p. 755–768, 11 Set 2008.

WANG, Xia e DAI, Jianwu. **Concise Review: Isoforms of OCT4 Contribute to the Confusing Diversity in Stem Cell Biology.** Stem Cells, v. 28, n. 5, p. 885–893, 23 Mar 2010.

WHO. **World Health Organization - Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles, 2018.**

WHO; IARC. **Erratum: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 70, n. 4, p. 313–313, 6 Abr 2020.

WU, Haofeng e colab. **The role of YAP1 in liver cancer stem cells: proven and potential mechanisms.** Biomarker Research, v. 10, n. 1, 7 Jun 2022.

XIA, Yan e colab. **YAP Promotes Ovarian Cancer Cell Tumorigenesis and Is Indicative of a Poor Prognosis for Ovarian Cancer Patients.** PLoS ONE, v. 9, n. 3, p. e91770, 12 Mar 2014..



XU, Guangzu e colab. **All the Tested Human Somatic Cells Express Both Oct4A and Its Pseudogenes but Express Oct4A at Much Lower Levels Compared with Its Pseudogenes and Human Embryonic Stem Cells.** *Stem Cells and Development*, v. 24, n. 13, p. 1546–1557, Jul 2015.

YAMADA, Kenneth M. e CUKIERMAN, Edna. **Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D.** *Cell*, v. 130, n. 4, p. 601–610, Ago 2007.

YIN, Amy H. e colab. **AC133, a Novel Marker for Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells.** *Blood*, v. 90, n. 12, p. 5002–5012, 15 Dez 1997.

YU, Zuoren e colab. **Cancer stem cells.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 44, n. 12, p. 2144–2151, Dez 2012.

ZANCONATO, Francesca e CORDENONSI, Michelangelo e PICCOLO, Stefano. **YAP/TAZ at the Roots of Cancer.** *Cancer Cell*, v. 29, n. 6, p. 783–803, Jun 2016.

ZHANG, Nailing e colab. **The Merlin/NF2 Tumor Suppressor Functions through the YAP Oncoprotein to Regulate Tissue Homeostasis in Mammals.** *Developmental Cell*, v. 19, n. 1, p. 27–38, Jul 2010. ZHAO, Bin e TUMANENG, Karen e GUAN, Kun-Liang. **The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal.** *Nature Cell Biology*, v. 13, n. 8, p. 877–883, Ago 2011.