



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

“Ação das proteínas LMP1 e RPMS1 do vírus de Epstein-Barr (EBV) na regulação de genes codificadores de proteínas de *checkpoint* imunológico em células humanas cultivadas *in vitro*”

ALISON FELIPE BORDINI BIGGI

Acadêmico

PROF. DR. DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA

Orientador

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada. Trabalho desenvolvido junto ao [ViriCan](#), grupo de pesquisa do Instituto de Biotecnologia (IBTEC).

**Botucatu, SP
dezembro de 2021**

“Ação das proteínas LMP1 e RPMS1 do vírus de Epstein-Barr (EBV) na regulação de genes codificadores de proteínas de *checkpoint* imunológico em células humanas cultivadas *in vitro*”

ALISON FELIPE BORDINI BIGGI

Acadêmico

DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA, PH.D.

Orientador

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada. Trabalho desenvolvido junto ao [ViriCan](#), grupo de pesquisa do Instituto de Biotecnologia (IBTEC).

**Botucatu, SP
dezembro de 2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Biggi, Alison Felipe Bordini.

Ação das proteínas LMP1 e RPMS1 do vírus de Epstein-Barr (EBV) na regulação de genes codificadores de proteínas de *checkpoint* imunológico em células humanas cultivadas *in vitro* / Alison Felipe Bordini Biggi. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

Capes: 40101045

1. Carcinogênese virótica.
2. Técnicas *in vitro*.
3. Herpesvirus humano
- 4.

Palavras-chave: Carcinogênese viral; Checkpoints imunológicos; Ensaio *in vitro*; Progressão tumoral; Vírus de Epstein-Barr.

Agradecimentos

O presente trabalho, cuja citação é apresentada abaixo, foi financiado com recursos provenientes do processo 2019/14324-9 (bolsa de mestrado), no âmbito do Convênio celebrado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para concessão de bolsas em Instituições públicas e privadas sem fins lucrativos de ensino superior do Estado de São Paulo. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e da CAPES.

BORDINI BIGGI, A. F. Ação das proteínas LMP1 e RPMS1 do vírus de Epstein-Barr (EBV) na regulação de genes codificadores de proteínas de checkpoint imunológico em células humanas cultivadas *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2021. 90p

Agradecimentos

Ao meu orientador, Deilson, por ter me dado a oportunidade de me capacitar possibilitando meu crescimento profissional e pela orientação.

Ao meu grupo de pesquisa, Virican, Bárbara, Beatrice, Brayan, Brunno, Guto e Viviana. Com vocês aprendi muito e sou eternamente grato pela nossa amizade.

A todos do grupo de Virologia do IBTEC, pela amizade e apoio especialmente nos últimos meses de mestrado.

A todos funcionários do IBTEC, pelo companheirismo e apoio durante o mestrado, em especial a Edna e a Simone.

Ao Henry Mongollon, pela ajuda com a estatística e a ele e a Gabi também por terem feito com que eu não me sentisse sozinho, especialmente nos últimos meses de mestrado.

Aos amigos que fiz em Botucatu por todo apoio e momentos especiais que compartilhamos, em especial a Kamila Voges que foi uma das primeiras pessoas a me acolher na cidade.

Sumário

1.	Resumo	12
2.	Abstract	13
3.	Introdução	14
3.1	Câncer: Generalidades	14
3.2	Vírus de Epstein-Barr	15
3.3	Modulação de resposta imunológica	19
3.4	Papel do EBV em <i>checkpoints</i> imunológicos	21
4.	Objetivos.....	23
4.1	Objetivo geral.....	23
4.2	Objetivos específicos	23
5.	Materiais e Métodos.....	24
5.1	Linhagens celulares.....	25
5.2	Análise de expressão de moléculas de <i>checkpoint</i> imunológico	27
5.3	Repressão de EBV LMP1 e RPMS1 por RNAi	29
5.4	Expressão de EBV LMP1 e RPMS1 em células EBV negativas	30
5.5	Análise dos resultados	31
6.	Resultados	32
6.1	Validação dos iniciadores.....	32
6.2	Painel de expressão de transcritos de moléculas de <i>checkpoints</i> imunológico.....	34
6.3	Repressão de EBV LMP1 e RPMS1 por dsRNA	36
6.4	Expressão de EBV LMP1 e RPMS1 em células transfectadas transientemente	39
6.5	Expressão de reguladores de <i>checkpoints</i> imunológicos	43
7.	Discussão	47
8.	Conclusões.....	51
9.	Referências	52
10.	Material Suplementar	58
11.	Apêndices	65
11.1	Apêndice I	65
11.2	Apêndice II	66
12.	Anexos	88
12.1	Anexo I	88

Índice de Figuras, Quadros e Tabelas

Figura 1 - Diagrama mostrando a localização dos genes latentes do EBV no epissoma de DNA viral de fita dupla [PMID: 15510157].	15
Figura 2 - Localização e direção da transcrição de fragmentos BamHI A (BART) de DNA de EBV [PMID: 1325642].	18
Figura 3 - Protocolo geral das etapas do estudo.	24
Figura 4 - Mapa dos construtos gerados com o gene BNLF1 do EBV, codificador da oncoproteína viral LMP1 (Müller-Coan 2016).	30
Figura 5 - Validação de iniciadores de PCR para análise de expressão de moléculas selecionadas de checkpoints imunológicos em nível transcricional. As linhagens celulares utilizadas para os alvos são: MCF-7 para B7-H3 (164 pb) e B7-H4 (100 pb); Rael para BTLA (97 pb); NP69 para PD-L1 (114 pb); e THP-1 para PD-L2 (190 pb), TIM-3 (189 pb) e VISTA (90 pb). Produto de PCR avaliado em gel de agarose 2% corado com corante intercalante Brilliant Green.	33
Figura 6 - Painel de expressão de transcritos de moléculas associadas a checkpoints imunológicos em linhagens linfoides in vitro constitutivamente infectadas pelo EBV. Foram empregados 200ng/μL de cDNA de amostra para cada replicata biológica. Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de RPS18 e HSP90. Linhagens utilizadas como controle de expressão: MCF-7 para B7-H3 (A) e B7-H4 (B); Rael para BTLA (C); BC-1 para CTLA-4 (D); NP69 para PD-L1 (E); e THP-1 para PD-L2 (F), TIM-3 (G) e VISTA (H). A) Apenas linhagem IBL-1 expressou B7-H3. B) Nenhuma das linhagens expressou B7-H4. C) Todas as linhagens expressaram BTLA (Referência da expressão diferencial: BC-1). D) Apenas linhagem BC-1 expressou CTLA-4. E) Todas as linhagens expressaram PD-L1 (Referência da expressão diferencial: Mutu I). F) As linhagens BC-1, IBL-1 e Jiyoye expressaram PD-L2 (Referência da expressão diferencial: BC-1). G) Todas as linhagens expressaram TIM-3 (Referência da expressão diferencial: BC-1). H) As linhagens BC-1 e IBL-1 expressaram VISTA (Referência da expressão diferencial: BC-1).	35
Figura 7 - Células Jiyoye transfectadas com sistema de eletroporação Neon™ (1,400v, 20ms, 2 pulsos) e 20nM de RNA BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Control. Em 24h pós-transfecção as células foram analisadas com azul de trypan por microscopia de contraste de fase (A) e por fluorescência em contador automático Countess II (ThermoFisher) (B).	37
Figura 8 - Células Jiyoye avaliadas 24h após eletroporação e transfectadas com dsRNAs. Resultados de análise por qPCR. A) Expressão do gene humano HPRT em nível transcricional na linhagem linfóide Jiyoye eletroporada sem dsRNA, com dsRNA controle negativo (CN) a 10nM e com dsRNA específico para o alvo HPRT em concentrações de 0,5nM, 10nM e 70nM. Normalização pela média dos níveis de expressão transcricional dos controles endógenos RPS18 e HSP90. B) Expressão de RPMS1 em linhagem linfóide Jiyoye eletroporada sem dsRNA, com 10nM de dsRNA CN e com dsRNAs específicos para RPMS1 em concentrações de 10nM, 50nM e 100nM para o dsIRPMS1_1; e 25nM e 200nM para o dsIRPMS1_2. Normalização pela média dos níveis de expressão transcricional dos controles endógenos RPS13 e HPRT.	38
Figura 9 - Células Ramos transfectadas utilizando Sistema de eletroporação Neon™ e 500ng de vetor PMax-GFP (Amaxa). 24h pós transfecção, as células foram analisadas por microscopia de luz (A) e fluorescência (B). Aumento final de 400x.	40
Figura 10 - Células Ramos em 24h pós transfecção transfectadas utilizando Sistema de eletroporação Neon™. Imagens de microscopia ótica de contraste de fase (à esquerda) e fluorescência (à direita). A) Células transfectadas sem vetor. B) Células transfectadas com 1μg do vetor repórter PMax-GFP (Amaxa) C) Células transfectadas com 1μg de vetor-base pEF1α-IRES-ZsGreen1 (Clontech); Nota-se aumento de morte celular e ausencia de fluorescência. D) Células transfectadas com 1μg do vetor recombinante pZsGLMP1_B958 (Muller-Coan, 2016). Nota-se aumento de morte celular, debris e ausencia de fluorescência. Magnificação de 400x.	41
Figura 11 - Células Ramos transfectadas com 1μg de vetor pEF1α-IRES-ZsGreen1 (Clontech) utilizando sistema de eletroporação Neon™ em 24h pós-transfecção A) 1350v 10ms 3x. B) 1350v 30ms 1x. C) 1550v 10ms 3x. D) 1550v 20ms 2x. E) 1300v 20ms 2x. F) 1300v 30ms 1x. G) 1400v 20ms 2x. Análises por fluorescência e magnificação de 400x.	42

Figura 12 - Células Ramos transfectadas com 1µg de vetor pZsGLMP1_B95-8 e pcDNARPMS1 48h após transfecção. Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de RPS18 e HSP90. Linhagem Akata utilizada como controle de expressão de LMP1 e RPMS1.43

Figura 13 – Níveis basais de expressão em nível transcricional de moléculas de checkpoint imunológico em células Ramos avaliadas por qPCR. Normalização pela expressão dos controles endógenos RPS18 e HSP90. VISTA, de menor expressão, é referência (expressão arbitrada em 1).44

Figura 14 - Expressão diferencial dos transcritos de BTLA, PD-L1 e TIM-3, 48h após transfecção com vetor codificante de EBV LMP1 e RPMS1, comparado a transfecção com vetor vazio. Normalização pela média de expressão dos controles endógenos humanos RPS18 e HSP90 para LMP1; e RPS13 e HPRT para RPMS1. * p < 0,05, ** p < 0,005.45

Quadro 1 - Linhagens celulares constitutivamente infectadas pelo EBV para análise do perfil de expressão de genes codificadores de moléculas de checkpoints imunológicos25

Quadro 2 - Linhagens celulares empregadas para a padronização de qPCR para análise de expressão gênica das moléculas de checkpoints imunológico selecionadas.....26

Quadro 3 - Listagem dos potenciais alvos em estudo para constituir painel de análise da expressão de moléculas com papel em checkpoints imunológicos potencialmente relevantes para a linfomagenese..27

Quadro 4 - Linhagens celulares empregadas para padronização dos iniciadores de genes de checkpoint imunológico32

Tabela 1 - Parâmetros e resultados da análise da eficiência de amplificação estimada para os iniciadores utilizados nos experimentos de qPCR para avaliação de genes codificadores de proteínas regulatórias de checkpoints imunológicos.34

Tabela 2 - Condições de eletroporação empregadas com sistema Neon e resultados de transfecção de linhagem Jiyoye utilizando controle de transfecção BLOCK-iT.....36

Tabela 3 - Condições de eletroporação empregadas com sistema Neon e resultados de transfecção de linhagem Ramos utilizando controle de transfecção PMax-GFP.....39

Figura S1 - Curvas de amplificação com os valores de R² alcançados e curvas de dissociação dos iniciadores selecionados para análise de expressão de genes codificadores de proteínas de checkpoint imunológico. As linhagens celulares utilizadas para os alvos são MCF-7 para B7-H3 e B7-H4; Rael para BTLA; BC-1 para CTLA-4; NP69 para PD-L1; e THP-1 para PD-L2, TIM-3 e VISTA. Foi realizado diluições seriadas 1:3 para os alvos BTLA, CTLA-4, PD-L2 e TIM-3; 1:5 para o alvo B7-H3; 1:2 para os alvos B7-H4 e PD-L1; e 1:10 para o alvo VISTA.....59

Figura S2 – Níveis de expressão em nível transcricional de moléculas de checkpoint imunológico em células Ramos avaliadas por qPCR, 48h após transfecção com vetor codificante de EBV LMP1 (A) e RPMS1 (B). Expressão gênica normalizada pela expressão de RPS18 e HSP90 para experimentos com EBV LMP1; e RPS13 e HPRT para experimentos com EBV RPMS1. Os resultados para células expressando LMP1 (A) apontam diminuição na expressão de transcrito de BTLA; aumento de expressão de transcrito de PD-L1 e TIM-3. Os resultados para células expressando RPMS1 (B) apontam aumento na expressão de transcrito de BTLA e TIM-3; e diminuição de transcrito de PD-L1. A expressão dos transcritos de B7-H3, B7-H4 e CTLA-4 se mantiveram não detectáveis em ambos tratamentos. A expressão diferencial dos transcritos de PD-L2 e VISTA não podem ser avaliados devido níveis de expressão inconsistentes.60

Figura S3 - Células NP69 após 48h de transfecção com 1µg de vetor pZsGLMP1_B95-8 e pcDNARPMS1. Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de RPS18 e HSP90. Linhagem IBL-1 utilizada como referência e controle de expressão de LMP1 e RPMS1.61

Figura S4 - Expressão diferencial dos transcritos de B7-H3, PD-L1 e PD-L2, em linhagem NP69, 48h após transfecção com vetor codificante de EBV LMP1 (A-C) e EBV RPMS1 (D-F). Expressão gênica normalizada pela expressão de RPS18 e HSP90 para experimentos com EBV LMP1; e RPS13 e HPRT para experimentos com EBV RPMS1. Os resultados para células expressando LMP1 apontam aumento na expressão de transcrito de B7-H3 (A), PD-L1 (B) e PD-L2 (C). Os resultados para células expressando RPMS1 apontam

aumento na expressão de transcrito de B7-H3 (D) e PD-L2 (F), e diferença não significativa para PD-L1 (E). Os genes de B7-H4, BTLA, CTLA-4, TIM-3 e VISTA se mantiveram sem expressão detectável com os tratamentos..... 62

Figura S5 - Human Protein Atlas. LAG-3. Dado disponível de v20.0.proteinatlas.org. Acesso em 26/11/2020 64

Quadro S1 - Listagem de iniciadores empregados para análise de expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas na regulação de checkpoints imunológicos 58

Tabela S1 - Valores dos Cts gerados a partir da amplificação por qRT-PCR dos genes codificadores de checkpoint imunológico analisados, nas condições experimentais avaliadas (células transfectadas com vetores vazios e codificantes de EBV LMP1 e RPMS1), para os as linhagens testadas (Ramos e NP69).... 63

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Definição por extenso	Em inglês
18S	RNA ribossomal 18S	<i>18S ribosomal RNA</i>
AGO2	Argonauta 2	<i>Argonaute-2</i>
APC	Célula apresentadora de antígeno	<i>Antigen-presenting cell</i>
B7-H3	B7 homólogo 3	<i>B7 homolog 3</i>
B7-H4	B7 homólogo 4	<i>B7 homolog 4</i>
BART	Transcritos à montante de BamHI-A	<i>BamHI-A rightward transcripts</i>
BL	Linfoma de Burkitt	<i>Burkitt Lymphoma</i>
BTLA	Atenuador de linfócitos B e T	<i>B- and T-cell lymphocyte attenuator</i>
CBF1/RPBJ	Proteína de ligação para sinal de recombinação da região kappa J da imunoglobulina	<i>Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin kappa J region</i>
cHL	Linfoma de Hodgkin Clássico	<i>Classic Hodgkin lymphoma</i>
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DLBCL	Linfoma difuso de grandes células B	<i>Diffuse Large B Cell Lymphoma</i>
dsRNA	RNA de dupla fita	<i>Double-stranded RNA</i>
EBER	Pequenos RNAs codificados pelo Vírus de Epstein-Barr	<i>Epstein-Barr virus-encoded small RNAs</i>
eBL	Linfoma de Burkitt endêmico	<i>Endemic Burkitt lymphoma</i>
EBNA	Antígeno nuclear do vírus de Epstein-Barr	<i>Epstein-Barr Nuclear Antigen</i>
EBV	Vírus de Epstein-Barr	<i>Epstein-Barr virus</i>
EBVaGC	Carcinoma gástrico associado ao EBV	<i>EBV-associated gastric carcinoma</i>
HBV	Vírus da Hepatite B	<i>Hepatitis B virus</i>
HCV	Vírus da Hepatite C	<i>Hepatitis C virus</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HL	Linfoma de Hodgkin	<i>Hodgkin lymphoma</i>
HPRT	Hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase	<i>Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase</i>
HPV	Papilomavírus humano	<i>Human papillomavirus</i>
HSP90	Proteína 90 de choque térmico	<i>Heat shock protein 90</i>
HTLV-1	Vírus linfotrópico de células T humanas 1	<i>Human T-lymphotropic virus 1</i>

Abreviatura	Definição por extenso	Em inglês
idBL	Linfoma de Burkitt relacionado a imunodeficiência	<i>Immune-deficiency Burkitt Lymphoma</i>
IFNγ		<i>Interferon-gamma</i>
IHC	Imunoistoquímica	<i>Immunohistochemistry</i>
KD		<i>Knock-down</i>
KSHV	Vírus do sarcoma de Kaposi	<i>Kaposi Sarcoma Virus</i>
LAG-3		<i>Lymphocyte activation gene-3</i>
LMP	Proteína latente de membrana	<i>Latent Membrane Protein</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
miRNA	Micro RNA	<i>microRNA</i>
ncRNA	RNA não codificante	<i>Non-coding RNA</i>
NPC	Carcinoma de nasofaringe	<i>Nasopharyngeal Carcinoma</i>
PB	Pares de bases	
PCR	Reação em cadeia da polimerase	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-1	Morte programada 1	<i>Programmed cell death 1</i>
PD-L1	Ligante 1 da PD-1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PD-L2	Ligante 2 da PD-1	<i>Programmed death-ligand 2</i>
RTqPCR/qPCR	PCR quantitativa em tempo real	<i>Quantitative real-time PCR</i>
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	RNA de interferência	<i>Interference RNA</i>
RPS13	Proteína ribossomal 13s	<i>Ribosomal Protein s13</i>
sBL	Linfoma de Burkitt esporádico	<i>Sporadic Burkitt Lymphoma</i>
siRNA	Pequeno RNA de interferência	<i>Small interfering RNA</i>
STR	Repetições curtas em tandem	<i>Short tandem repeats</i>
TAM	Macrófagos associados a tumor	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TCR	Receptor de linfócitos T	<i>T-cell receptor</i>
TIM-3		<i>T cell Ig domain and mucin domain protein 3</i>
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
VISTA		<i>V-domain Ig suppressor of T cell activation</i>

1. Resumo

A maior parcela da população mundial adulta apresenta infecção latente pelo vírus de Epstein-Barr (EBV), reconhecida como potencialmente cancerígena para humanos. Esse vírus é encontrado nas células neoplásicas de virtualmente todos os casos da forma endêmica africana do linfoma de Burkitt e do carcinoma indiferenciado de nasofaringe, além de estar associado ao desenvolvimento de parcela de outros cânceres, especialmente linfomas. A fase latente do ciclo biológico do EBV é caracterizada por restrição na expressão de alguns produtos virais, o que favorece sua imunoevasão e infecção persistente no hospedeiro. Por outro lado, a expressão de alguns genes do EBV durante o ciclo latente viral pode efetuar regulação de *checkpoints* imunológicos, indicando que o EBV também pode beneficiar a carcinogênese por esse mecanismo. Embora há alguns indícios de ação da oncoproteína viral LMP1 na expressão de PD-L1 e CTLA-4, são escassos os dados sobre outros produtos virais do EBV na regulação de *checkpoints* imunológicos, incluindo a proteína viral RPMS1. Assim, este estudo avaliou os efeitos da expressão dos genes LMP1 e RPMS1 do EBV na regulação de genes codificadores de proteínas de *checkpoints* imunológicos empregando linhagens de células neoplásicas derivadas de linfomas EBV-positivos. Para tanto, foram desenhados iniciadores para análise da expressão em nível transcricional de genes codificadores para as seguintes moléculas reguladoras de *checkpoints* imunológicos: B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, LAG-3, PD-L1, PD-L2, TIM-3 e VISTA. Por problemas na repressão dos produtos virais, vetores com expressão constitucional de LMP1 e RPMS1 foram transfectados transientemente em linhagem Ramos para avaliação dos possíveis efeitos em relação à expressão das moléculas de *checkpoint* imunológico investigadas. Foi observado que, a nível transcricional, as células que expressavam LMP1 apresentaram diminuição de BTLA e aumento de PD-L1 e TIM-3; enquanto que células que expressavam RPMS1 apresentaram diminuição de PD-L1 e aumento de BTLA e TIM-3. Esses resultados apontam interação de LMP1 e RPMS1, não previamente descrita, com moléculas associadas com *checkpoints* imunológicos, contribuindo para um melhor entendimento sobre a atuação do vírus na etiopatogenia e progressão de cânceres, além de subsidiar possível desenvolvimento de terapias a base de moduladores de *checkpoints* imunológicos para portadores de cânceres associados ao EBV.

2. Abstract

Most of the world's adult population has latent Epstein-Barr virus (EBV) infection, recognized as potentially carcinogenic to humans. This virus is found in neoplastic cells of virtually all cases of the African endemic form of Burkitt's lymphoma and of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma, in addition to being associated with the development of a portion of other cancers, especially lymphomas. The latent phase of EBV biological cycle is characterized by restriction in the expression of some viral products, which favors its immunoevasion and persistent infection in the host. On the other hand, the expression of some EBV genes during the latent viral cycle can regulate immune checkpoints, indicating that EBV can also benefit carcinogenesis through this mechanism. Although there is some evidence for the role of the viral oncoprotein LMP1 on the expression of PD-L1 and CTLA-4, data on other EBV viral products in the regulation of immune checkpoints, including the viral protein RPMS1 are scarce. Thus, this study evaluated the effects of the expression of EBV LMP1 and RPMS1 genes in the regulation of genes encoding immune checkpoint using EBV-positive lymphoma-derived neoplastic cell lines. Therefore, primers were designed to analyze the expression at transcriptional level of genes encoding the following immune checkpoint molecules: B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, LAG-3, PD-L1, PD-L2, TIM-3 and VISTA. Due to problems in the knock-down of viral products, vectors with constitutional expression of LMP1 and RPMS1 were transiently transfected into Ramos cell line to evaluate their possible effects in the expression of the investigated immune checkpoint molecules. It was observed that, at transcriptional level, Ramos cells that expressed LMP1 showed a decrease in BTLA and an increase in PD-L1 and TIM-3; while cells that expressed RPMS1 showed a decrease in PD-L1 and an increase in BTLA and TIM-3. These results point to an interaction, not previously described, between LMP1 and RPMS1 with molecules associated with immune checkpoints, contributing to a better understanding of the role of the virus in the etiopathogenesis and progression of cancers, in addition to supporting the possible development of therapies based on checkpoint inhibitors for patients with EBV-associated cancers.

3. Introdução

3.1 Câncer: Generalidades

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam mais de 14 milhões de novos casos de cânceres em todo o mundo, além de 8 milhões de óbitos associados a essas doenças. Países desenvolvidos tendem a apresentar alta incidência dessas doenças. Por outro lado, deficiências na detecção precoce e conduta médica para os pacientes oncológicos (incluindo acesso a métodos mais efetivos de diagnóstico e tratamento) nos países em desenvolvimento tornam o impacto dos cânceres até mais significativo nesses países em relação aos países desenvolvidos (FERLAY et al., 2015). Essa situação se aplica ao Brasil, onde mais de 620 mil novos casos de cânceres foram estimados para ocorrerem no triênio 2020 e 2022 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2020).

Alguns cânceres, tais como carcinomas de mama e próstata, apresentam perfil epidemiológico relativamente semelhante entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, enquanto outros estão fortemente relacionadas ao perfil socioeconômico. Casos de carcinoma de pulmão, por exemplo, tendem a estar relacionados a urbanização e predominar em países mais desenvolvidos; por outro lado, países com condições socioeconômicas menos favoráveis apresentam maior prevalência de carcinomas de colo de útero e de estômago, ambos com componente infeccioso em sua etiologia (FERLAY et al., 2015). A propósito, mais de 2 milhões de novos casos de câncer associados a infecções por microrganismos foram documentados em 2018, segundo análises recentes de dados do programa GLOBOCAN da Organização Mundial da Saúde (OMS) (MARTEL et al., 2020).

Estudos sobre a carcinogênese associada a agentes infecciosos têm repercussões significativas, quer porque essas doenças predominam em países em desenvolvimento, ou pela maior facilidade de seu controle em relação aos cânceres com outros fatores etiológicos. Até o momento, são reconhecidamente cancerígenas para humanos as infecções pelos vírus da hepatite B (*Hepatitis B virus* – HBV), vírus da hepatite C (*Hepatitis C virus* – HCV), papilomavírus humanos (*Human Papillomaviruses* - HPV), vírus linfotrópico humano de células T tipo 1 (*Human T-lymphotropic Virus type 1* - HTLV-1) o herpes vírus do sarcoma de Kaposi (*Kaposi Sarcoma Herpesvirus* - KSHV) e o vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus* - EBV) (IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2011). Dentre esses agentes, o EBV merece particular atenção em virtude de sua ubiquidade e importante potencial oncogênico, sendo abordado em mais detalhes a seguir.

3.2 Vírus de Epstein-Barr

Em 1958, o cirurgião britânico Denis Burkitt reportou os primeiros casos de tumores sarcomatoides acometendo crianças da África equatorial, usualmente manifestos com acometimento mandibular. Anos mais tarde essa doença foi reconhecida como uma forma agressiva de linfoma, batizado como linfoma de Burkitt (*Burkitt Lymphoma* - BL). Amostras originais de Denis Burkitt foram compartilhadas com o patologista britânico Michael A. Epstein, que empregou microscopia eletrônica para análise de linhagens celulares linfoblastoides derivadas do LB. Esses estudos revelaram partículas virais com aspectos estruturais consistentes com os de herpesvirus, culminando com a descrição original do EBV em 1965 (YOUNG; YAP; MURRAY, 2016).

O EBV é um vírus ubíquo que infecta a maioria da população mundial ainda na infância. Participa da etiopatogênese de diversos cânceres humanos, particularmente os de origem linfoide ou epitelial. Formalmente denominado herpesvírus humano 4 (*Human herpesvirus 4* – HHV4), o EBV pertence à subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero *Lymphocryptovirus*. O genoma do EBV é constituído de DNA de dupla fita com cerca de 172kb, que codifica mais de 80 genes. Tem nucleocapsídeo icosaédrico e a partícula do EBV possui ainda envelope formado por bicamada lipídica, na qual são incluídas glicoproteínas virais que participam na infecção das células do hospedeiro (ARVIN et al., 2007).

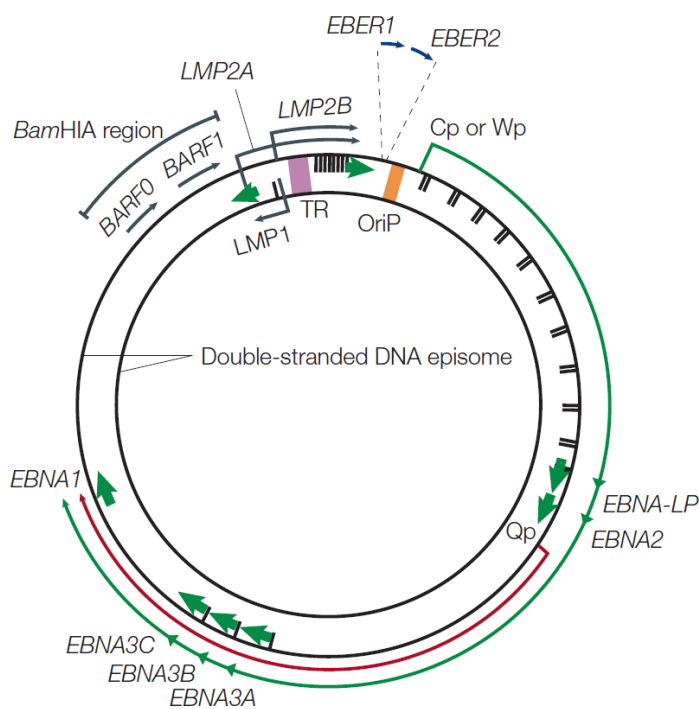


Figura 1 - Diagrama mostrando a localização dos genes latentes do EBV no epissoma de DNA viral de fita dupla (YOUNG; RICKINSON, 2004)

O EBV possui afinidade por células epiteliais e linfócitos B, embora possa também infectar outras células, como linfócitos T e células de músculo liso. Desde sua descoberta em 1964 (ESAU, 2017), o EBV tem sido detectado nas células neoplásicas de diversos cânceres, como a forma endêmica do linfoma de Burkitt e carcinomas de nasofaringe (*Nasopharyngeal carcinoma* - NPC), além de parcela dos casos da forma clássica do Linfoma de Hodgkin (*Hodgkin Lymphoma* - HL), de linfomas não-

Hodgkin em pacientes imunossuprimidos, fração dos casos de carcinomas gástricos, dentre outros (YOUNG; RICKINSON, 2004).

A transmissão do EBV ocorre basicamente pela saliva e o contágio se dá com a infecção de células epiteliais da orofaringe, nas quais o vírus se replica e libera partículas virais para infectar linfócitos B locais. A infecção primária pelo o EBV geralmente é assintomática ou causa mononucleose infecciosa, um distúrbio linfoproliferativo benigno que habitualmente deflagra resposta imunitária que controla a infecção (YOUNG; YAP; MURRAY, 2016). O EBV utiliza sua glicoproteína B (gB) e o complexo gH/gL para infectar tanto células epiteliais como linfócitos B. Entretanto, na infecção de linfócitos B a infecção também requer as glicoproteína gp42 e gp350, que interagem, respectivamente, com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex* – MHC) de classe II e a molécula CD21 (MATSUURA et al., 2010), receptor para o fragmento C3d do complemento (CARROLL; ISENMAN, 2012).

O EBV infecta linfócitos B *naïve* do hospedeiro, ocasionando proliferação e expansão dessas células. Esses linfócitos migram para folículos linfóides, onde participam da reação de centro germinativo, do qual sairão como linfócitos B de memória latentemente infectados pelo vírus. Eventualmente essas células voltam para a cavidade orofaríngea e se diferenciam em células plasmáticas, culminando em replicação viral e liberação de novos virions que infectarão outras células ou outros hospedeiros (IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2012).

O ciclo biológico do EBV é dividido em duas fases principais, denominadas ciclo lítico e ciclo latente. Alguns programas de expressão gênica do ciclo latente do EBV são tradicionalmente reconhecidos, denominados programas de latência tipo I, II e III. A latência tipo III ocorre in vivo em linfócitos B *naïve*, células nas quais o vírus expressa todo o seu repertório de genes de latência, incluindo seis antígenos nucleares do EBV (*EBV nuclear antigens* - EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C e LP), três proteínas latentes de membrana (*Latent membrane proteins* - LMP1, 2A e 2B) e alguns RNA não-codificantes, tais como os pequenos RNAs do EBV (*EBV-encoded small RNAs* - EBERs). A latência tipo II tem início quando linfócitos B *naïve* migram para o centro germinativo e se caracteriza por maior restrição da expressão gênica viral, com expressão de EBNA1, LMP1 e LMP2a. Ao emigrarem dos nódulos linfáticos as células infectadas pelo EBV podem se tornar linfócitos B em repouso, nos quais essencialmente não ocorre expressão de produtos virais – um estado denominado latência “zero”. Por outro lado, em células que se diferenciam em linfócitos B de memória o EBV estabelece latência tipo

I, perfil no qual a expressão de produtos virais se limita basicamente a EBNA1 e EBERs (YOUNG; YAP; MURRAY, 2016).

A elevada restrição de expressão gênica viral nas latências tipo zero e I contribui para escape da resposta imunológica pelo vírus, propiciando persistência da infecção pelo EBV por toda a vida do hospedeiro (YOUNG; YAP; MURRAY, 2016). Em situações propícias, a ativação dos linfócitos B de memória infectados ocasiona diferenciação destas em plasmócitos, com reativação do ciclo lítico e ampla expressão de produtos virais para produção de novas partículas do EBV, o que tipicamente ocasiona morte celular pelos efeitos citopáticos ocasionados pela liberação dessas partículas (MURATA; TSURUMI, 2014).

Além de atuarem no ciclo biológico viral, diversos produtos do EBV também podem contribuir para o desenvolvimento de cânceres associados ao vírus. Nesse sentido, é importante notar que células neoplásicas de diversos linfomas de células B associados ao EBV exibem perfil de expressão de produtos virais compatíveis com os programas de latência I, II ou III, situação remanescente do estágio de diferenciação da célula de origem da doença (YOUNG; YAP; MURRAY, 2016).

Dentre os produtos do EBV com papel importante na carcinogênese merece destaque a LMP1, oncoproteína viral que deflagra sinalização semelhante àquela que ocorre pela ativação do receptor CD40, molécula da família de receptores para o fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor receptor* – TNFR), que atua no crescimento e diferenciação dos linfócitos B e tem importante papel na imortalização dessas células (UCHIDA et al., 1999). A LMP1 tem atividade transformante para linfócitos B tanto *in vitro* como *in vivo*, o que se dá pela ativação de múltiplas vias intracelulares de sinalização, incluindo NF- κ B, JNK e JAK/ STAT (ELIOPOULOS; YOUNG, 1998; GIRES et al., 1999; HUEN et al., 1995). LMP1 também induz expressão de proteínas antiapoptótica (e.g., bcl-2 (HENDERSON et al., 1991)) e A20 (LAHERTY et al., 1992)), produção de citocinas inflamatórias (e.g., IL-6 e IL-8 (ELIOPOULOS et al., 1999)), e também interfere em pontos de restrição (*checkpoints*) imunológicos, o que será melhor detalhado adiante (vide Seção 2.4).

A RPMS1 é um dos produtos gerados a partir de processamento alternativo (*splicing*) do segmento transcrito BamHI A direito (*BamHI-A rightward transcripts - BART*) do genoma do EBV, tipicamente expresso durante a latência viral (AL-MOZAINI et al., 2009). A expressão de RPMS1 pode ser encontrada em diferentes cânceres associados ao

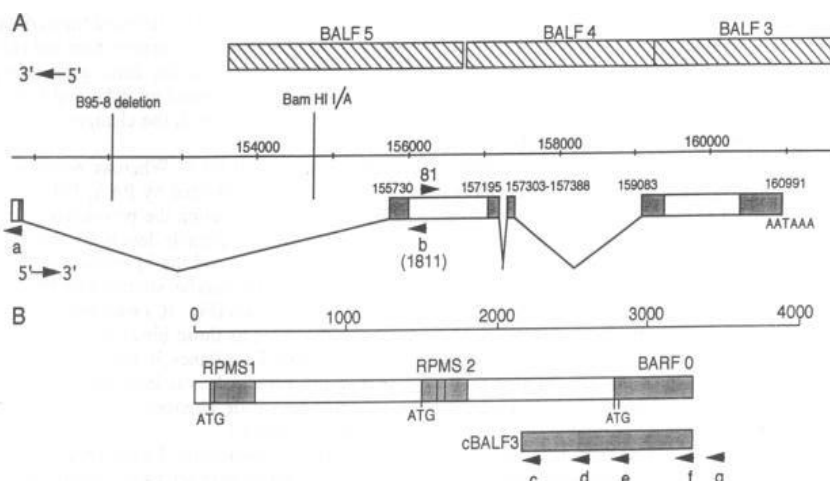


Figura 2 - Localização e direção da transcrição de fragmentos BamHI A (BART) de DNA de EBV (KARRAN et al., 1992).

EBV, como NPC, carcinoma gástrico e linfomas EBV-positivos (WU et al., 2018; YAMAMOTO; IWATSUKI, 2012). Um estudo publicado em 2004 com 54 casos de NPC relatou detecção da expressão de RPMS1 por qPCR em mais de 80% (45/54) das biopsias tumorais, mas em apenas 4% (1/25) de amostras de tecido de nasofaringe não cancerígeno com infecção crônica por EBV. Ensaios *in vitro* revelaram que células HEK293 transfectadas com vetor para expressão de RPMS1 exibiram maior taxa de proliferação, menor tempo de duplicação e maior capacidade de formar colônias em ensaio de crescimento independente de ancoragem, além de maior capacidade de gerar tumores *in vivo* (LI et al., 2005). Previamente, Smith et. al (2000) relataram interação da RPMS1 do EBV com CBF1/RPB-jk, um componente da via de sinalização Notch, de modo a agir como modulador negativo de sua ativação (SMITH et al., 2000). A CBF1 faz parte do complexo CSL, que atua propicia transcrição de genes Notch-responsivos, incluindo proteínas conhecidamente importantes na carcinogênese, como p21 e MYC (RANGANATHAN; WEAVER; CAPOBIANCO, 2011). Coletivamente, esses resultados sugerem que a proteína RPMS1 do EBV pode ter potencial transformante e eventualmente contribui para o desenvolvimento de cânceres associados à infecção viral.

Embora seja chave para a carcinogênese, a transformação celular não é suficiente para o desenvolvimento dos cânceres, o que também requer subversão da resposta imunitária do hospedeiro para pleno estabelecimento da doença. Nesse sentido, a expressão de produtos do EBV pode beneficiar a carcinogênese também pela modulação da resposta imunitária, o que será discutido a seguir.

3.3 Modulação de resposta imunológica

Diariamente os organismos estão expostos a diversos estímulos potencialmente nocivos para a homeostase de seus tecidos, tais como radiações, substâncias tóxicas e microrganismos patogênicos. Em termos gerais, compete ao sistema imunitário minimizar essas agressões, sendo que sua atividade é regulada por mecanismos que modulam as respostas de defesa visando não comprometer a integridade estrutural e funcionalidade dos tecidos (CHAPLIN, 2010).

Tanto a imunidade contra infecções virais como a desencadeada contra células neoplásicas malignas dependem em grande medida da atividade de linfócitos T. Em condições normais, a atividade dessas células habitualmente se segue ao reconhecimento de antígenos mediado pelo receptor de linfócitos T (*T cell receptor* – TCR). Esses antígenos são apresentados por células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells* – APC), que oferecem ao linfócito T peptídeos associados a moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC). Além do TCR, moléculas co-estimulatórias (tais como CD28, expressa em linfócitos T, e seus receptores CD80 e CD86, expressos em APCs), atuam na ativação dos linfócitos T de modo a intensificar a resposta mediada pelo TCR, além de favorecer a sobrevivência dessas células e produção de citocinas. A apresentação de antígenos sem atividade de moléculas coestimulatórias frustra a ativação dos linfócitos T, tornando-os hipo-responsivos ou anérgicos, mecanismo de segurança contra respostas imunitárias inadvertidas ou autoimunidade. Ainda, linfócitos T expressam também receptores inibitórios que ajustam sua atividade, por exemplo, pela restrição da ligação das moléculas coestimuladoras ou da sinalização intracelular deflagrada (PENNOCK et al., 2013).

Coletivamente, os sinais coestimuladores e inibitórios que controlam as respostas imunológicas mediadas por linfócitos T constituem os chamados *checkpoints* imunológicos, que tipicamente dependem de várias moléculas expressas na superfície celular, tais como a proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (*Cytotoxic T-lymphocyte protein 4* - CTLA-4) e receptor de morte programada 1 (*Programmed Death 1* - PD-1). CTLA-4 é expresso em linfócitos T e controla negativamente a ativação destas células por competir com o receptor coestimulador CD28 pelos ligantes CD80 e CD86 (ou B7.1 e B7.2, respectivamente). Por possuir maior afinidade com CD80 em relação ao receptor CD28, CTLA-4 atua como antagonista da coestimulação mediada por CD28, reduzindo ou inibindo a ativação dos linfócitos T (WALKER; SANSOM, 2011). PD-1, por sua vez, é um receptor imunoinibitório expresso em linfócitos T e outras células do sistema imunológico, tendo como ligantes as moléculas PD-L1 e PD-L2, expressas em células hematopoiéticas e epiteliais. A interação da

PD-1 com seus receptores, assim como o CTLA-4, controla o grau de resposta dos linfócitos T de modo a regular respostas de autoimunidade e tolerância periférica dos linfócitos T durante processos inflamatórios, infecciosos e cancerígenos, como forma de prevenir danos aos tecidos. A expressão de PD-1 em linfócitos T leva a exaustão ou até mesmo apoptose destas células, fenômenos tipicamente observados em situações de inflamação crônicas e em cânceres (SHARPE; PAUKEN, 2018).

Diversos estudos têm apontado papel dos *checkpoints* na linfomagenese e no prognóstico de cânceres. Por exemplo, a hiperexpressão de PD-L1 é documentada em HL e NHL de linfócitos B, o que contribui para escape imunitário e favorece a progressão tumoral. A hiperexpressão de PD-L1 nas células neoplásicas de linfomas pode resultar de diversos mecanismos, tais como amplificação do segmento genômico no qual o gene de PD-L1 está mapeado (9p24.1), produção de citocinas como o interferon gama (IFN γ), ativação das vias JAK/STAT, dentre outros (GALANINA; KLINE; BISHOP, 2017). Pacientes com linfoma difuso de grandes células B (*Diffuse large B-cell lymphoma* – DLBCL) cujas células neoplásicas eram positivas para PD-L1 apresentaram taxa de sobrevida inferior comparado a pacientes sem expressão de PD-L1 no tumor, além da maior taxa de morte relacionada a progressão do linfoma. Adicionalmente, pacientes com células neoplásicas expressando PD-L1 mas com baixa população de linfócitos PD-1+ apresentam pior prognóstico em relação a pacientes cujas células neoplásicas não expressam PD-L1 mas possuem grandes populações de linfócitos PD-1+ (GRAVELLE et al., 2017). A expressão de PD-L2 em linfomas é documentada em linfoma primário de mediastino (SHI et al., 2014) e é encontrada hiperexpressa devido a alterações em 9p24.1 no HL clássico (cHL) (ROEMER et al., 2016). O receptor imunoinibitório *T-Cell Immunoglobulin And Mucin-Domain Containing-3* (TIM-3) também interfere no prognóstico de linfoma, conforme exemplificado por um estudo que reportou uma menor sobrevida livre de progressão para linfoma folicular em pacientes que apresentavam elevada porcentagem de células imunológicas positivas para TIM-3 no microambiente tumoral (GRAVELLE et al., 2016).

Apesar de avanços no tratamento dos linfomas, algumas dessas doenças mais frequentemente podem apresentar evolução clínica desfavorável (ANSELL, 2015; SHANBHAG; AMBINDER, [s.d.]). Ainda, linfomas com expressão significativa de moléculas de *checkpoints* imunológicos estão relacionados com um pior prognóstico da doença, como relatado em pacientes com DLBCL e linfoma folicular (KIYASU et al., 2015; ROSSILLE et al., 2017; YANG et al., 2017). Assim, investigar a contribuição da infecção pelo EBV na modulação de *checkpoints* imunológicos pode contribuir na elucidação da etiopatogenia de

linfomas associados ao vírus, bem como oferecer dados importantes para melhor gestão do cuidado de saúde para os pacientes com essas doenças.

3.4 Papel do EBV em *checkpoints* imunológicos

A relação entre infecção pelo EBV e a modulação de moléculas de *checkpoint* imunológico tem sido investigada em estudos publicados recentemente (ANASTASIADOU et al., 2018; BI et al., 2016, p. 1). Por exemplo, foi relatada indução da expressão de PD-L1 pela oncoproteína viral LMP1, em virtude de sua interferência em diversas vias de sinalização (e.g., JAK/STAT e NF- κ B), além de favorecer a produção da citocina inflamatória IFN- γ (BI et al., 2016; FANG et al., 2015; GREEN et al., 2012). Também foi relatado que EBNA2 induz a expressão de PD-L1 e reduz a expressão do microRNA humano miR-34a no DLBCL e no BL. A baixa expressão de miR-34a em células derivadas de DLBCL EBV-neg. U2932 transfectadas com EBNA2 proporcionou elevação da expressão de PD-L1; por outro lado, a superexpressão ectópica de miR-34a nessas células proporcionou redução da expressão dessa molécula imunomodulatória (ANASTASIADOU et al., 2018, p. 2).

Utilizando modelo de ratos humanizados, Ma e colaboradores (2016) estudaram o desenvolvimento de linfomas associados ao EBV e relataram expressão de PD-L1 e PD-L2 em linfócitos B infectados pelo vírus. Adicionalmente, verificaram expressão de PD-L1 associada à expressão da EBNA2 viral, além de expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T de modelos murinos infectados com EBV. Após inibição dos receptores PD-1 e CTLA-4, foi observada redução do tamanho dos tumores induzidos pelo EBV, aumento da secreção de IFN γ e diminuição no número de células neoplásicas infectadas pelo EBV – tanto aquelas em ciclo lítico como aquelas em ciclo latente viral. Com base nesses resultados, os autores sugeriram que o tratamento com anticorpos contra PD-1 e CTLA-4 possibilitou melhor ação antitumoral nos linfócitos por potencializar o reconhecimento de antígenos virais pelos de linfócitos T (MA et al., 2016).

Um estudo com carcinoma gástrico associado ao EBV (*EBV-associated gastric carcinoma* – EBVaGC) reportou alta expressão de PD-L1 não restrita à amplificação de 9p24.1 tanto em células tumorais quanto em células imunológicas, indicando múltiplos mecanismos pelo qual o EBV induz a expressão dessa molécula (DERKS et al., 2016). Em comparação ao carcinoma gástrico sem associação ao EBV, a expressão de PD-L1 no EBVaGC foi mais frequente e mais intensa (BÖGER et al., 2016). Em outro estudo, a expressão do receptor imunoinibitório VISTA se correlacionou à expressão de PD-L1 em células imunitárias e células neoplásicas de EBVaGC, mas não foi significativamente associada ao EBV (BÖGER et al.,

2017). Aumento na expressão de PD-L1 também foi relatado em casos de carcinoma pulmonar linfoepitelioma-símile associado ao EBV; nesse estudo, pacientes com PD-L1 elevado apresentaram menor sobrevida livre de doença e de sobrevida em 5 anos comparativamente aos pacientes com baixa expressão da molécula (FANG et al., 2015).

O desenvolvimento e comportamento biológico de cânceres associados ao EBV depende de diversos fatores que contribuem para a susceptibilidade à infecção viral e distúrbios das respostas imunitárias contra o vírus, incluindo fatores ambientais e constitucionais. Sabe-se que alguns produtos do EBV, como a LMP1, podem modular a agressividade da doença e favorecer a progressão tumoral (ELGUI DE OLIVEIRA; MÜLLER-COAN; PAGANO, 2016). Por outro lado, ainda é precário o conhecimento sobre a ação de outros produtos virais, tais como a proteína RPMS1, que ainda é pouco estudada e para a qual nada se sabe quanto a uma eventual contribuição na modulação imunitária.

A imunoterapia por manipulação de *checkpoints* imunitários – baseada essencialmente na modificação de vias regulatórias da imunidade antitumoral – é uma estratégia recentemente empregada para aperfeiçoamento do tratamento de cânceres. Nos últimos anos, resultados promissores para o tratamento de diferentes cânceres têm sido obtidos com anticorpos monoclonais dirigidos a PD-1 e CTLA-4 (CHEN; MELLMAN, 2017), o que tem estimulado maior interesse na manipulação de *checkpoints* imunitários para interferir na história natural dessas doenças. Por essa razão, este estudo pretende avaliar os efeitos de produtos virais oncogênicos do EBV na expressão de moléculas de *checkpoints* imunológicos, a fim de subsidiar dados sobre a atuação do vírus e os efeitos dessas moléculas em cânceres associados ao EBV.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

O presente estudo visa avaliar a hipótese de que as proteínas virais LMP1 e RPMS1 do EBV podem modular a expressão de moléculas envolvidas em *checkpoints* imunológicos em linhagens de células neoplásicas derivadas de linfomas constitutivamente infectados pelo vírus.

4.2 Objetivos específicos

1. Analisar o perfil de expressão de moléculas de *checkpoint* imunológicos em linhagens celulares de linfomas associados ao EBV.
2. Analisar os efeitos de LMP1 e RPMS1 do EBV na regulação da expressão de moléculas moduladoras de *checkpoint* imunitários em células linfoides humanas cultivadas *in vitro*.
3. Identificar moléculas de *checkpoint* imunológico regulada(s) pela expressão de EBV LMP1 ou RPMS1.

5. Materiais e Métodos

A figura 3 apresenta o desenho geral do estudo.

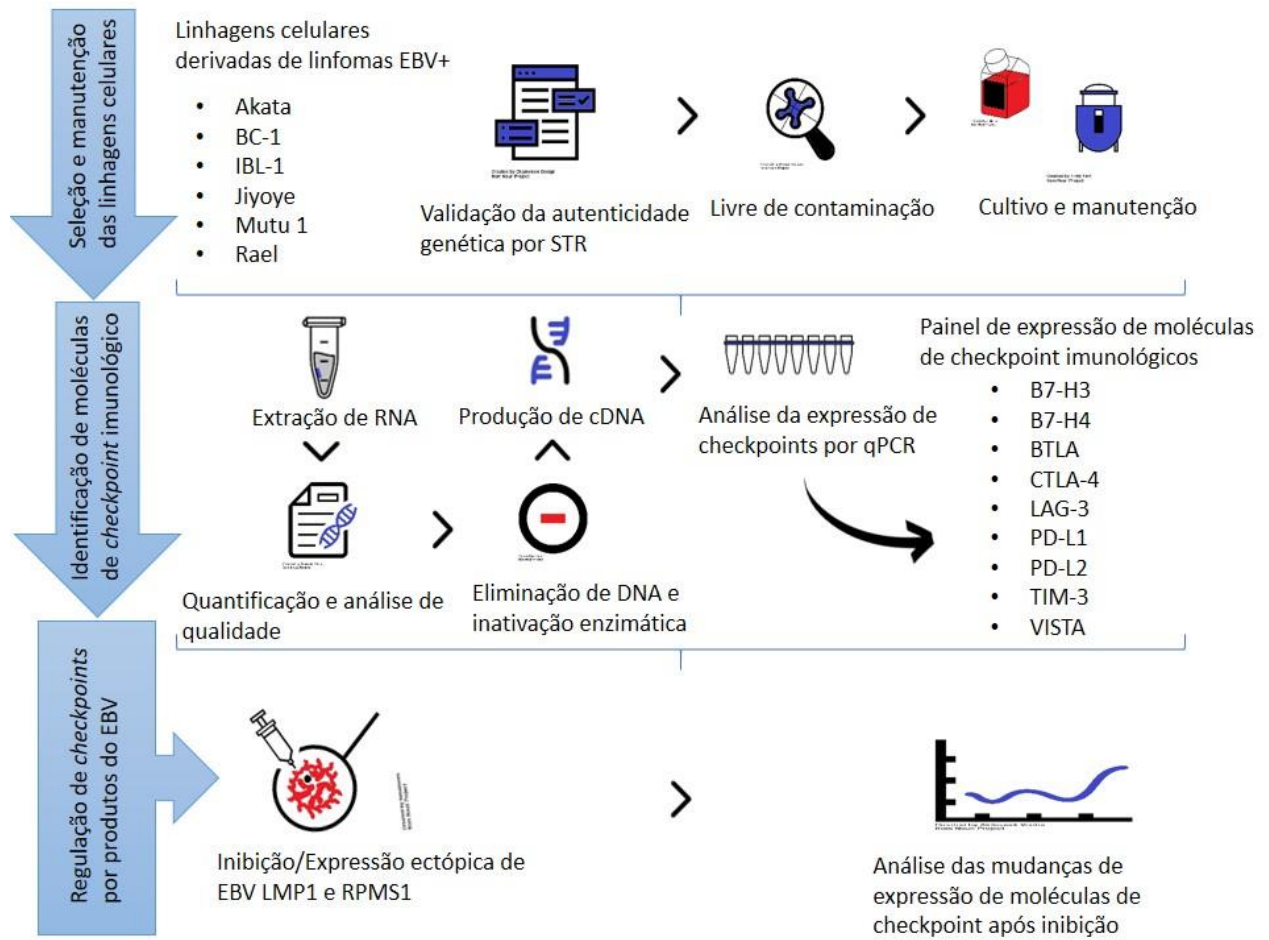


Figura 3 - Protocolo geral das etapas do estudo

5.1 Linhagens celulares

O Quadro 1 apresenta as linhagens celulares constitutivamente infectadas pelo EBV que foram avaliadas quanto ao perfil de expressão de moléculas relacionadas a *checkpoints* imunológicos.

Quadro 1 - Linhagens celulares constitutivamente infectadas pelo EBV para análise do perfil de expressão de genes codificadores de moléculas de *checkpoints* imunológicos

Linhagem	Descrição	EBV ¹	KSHV ²	RRID ³ .
Akata	Linfoma de Burkitt(TAKADA et al., 1991)	Lat.I	Neg	CVCL_0148
BC1	Linfoma de efusão primária (paciente HIV+; fluído ascítico) (FAN et al., 2005)	Lat I	Pos	CVCL_1079
IBL1	Linfoma difuso de grandes células B de paciente portador de HIV(GUASPARRI; BUBMAN; CESARMAN, 2008)	Lat. II/III	Neg	CVCL_9638
Jiyoye	Linfoma de Burkitt(MCCORMICK et al., 1969)	Lat.I	Neg	CVCL_1317
Mutu I	Linfoma de Burkitt(HABESHAW et al., 1999)	Lat.I	Neg	CVCL_7202
Rael	Linfoma de Burkitt(KLEIN; DOMBOS; GOTHOSKAR, 1972)	Lat.I	Neg	CVCL_7208

⁽¹⁾ EBV: situação de infecção pelo EBV (Lat. - programas de latência I, II ou III);⁽²⁾ KSHV: presença ou ausência de coinfeção pelo KSHV; ⁽³⁾ Código de identificação de recursos de pesquisa (*Research Resource Identifier - RRID*), rastreável na plataforma *Cellosaurus* (<https://web.expasy.org/cellosaurus>)(BAIROCH, 2018).

Células criopreservadas das linhagens indicadas no Quadro 1 foram generosamente cedidas ao Grupo de Estudos em Carcinogênese Viral e Biologia dos Cânceres (ViriCan), no Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UNESP, campus Botucatu, SP, pelos grupos de pesquisa liderados pela Profa. Dra. Ethel Cesarman, da Universidade de Cornell, New York, NY, USA (linhagens BC-1, IBL1, Jiyoye e Rael) e pelo Prof. Dr. Benjamin Gewurz, da Universidade de Harvard, Boston, MA, USA (linhagens Akata e Mutu I).

Além das linhagens selecionadas para análise da expressão das moléculas de *checkpoints* imunitários, as linhagens identificadas no Quadro 2 foram empregadas na etapa de padronização do método de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) quantitativa (qPCR) afim de encontrar controles positivos para análise de expressão

gênica, conforme descrito na seção 5.2. A linhagem THP-1 foi cedida pelo prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Unesp de Botucatu. As linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram cedidas pelo prof. Dr. Ramon Kaneno, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Unesp de Botucatu. As linhagens NP69^{SV40T} e Jurkat foram doadas pela Prof. Dra. Ethel Cesarman, da Universidade de Cornell. A linhagem PC-3 foi doada pela Prof. Dra. Flavia Karina Delella, do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da Unesp de Botucatu. A linhagem SaOS-2 foi cedida pela Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (USP).

Quadro 2 - Linhagens celulares empregadas para a padronização de qPCR para análise de expressão gênica das moléculas de checkpoints imunológico selecionadas

Linhagem	Descrição ¹	RRID ²
Jurkat	Leucemia linfoblástica aguda de células T	CVCL_0065
MCF-7	Adenocarcinoma ductal de mama; células metastáticas (efusão pleural)	CVCL_0031
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama; células metastáticas (efusão pleural)	CVCL_0062
NP69^{SV40T}	Células imortalizadas de nasofaringe	CVCL_F755
PC-3	Carcinoma de próstata; células metastáticas (osso)	CVCL_0035
SaOS-2	Osteosarcoma osteoblástico	CVCL_0548
THP-1	Leucemia monocítica aguda	CVCL_0006

⁽¹⁾ Descrição original da linhagem; ⁽²⁾ Código de identificação de recursos de pesquisa (*Research Resource Identifier - RRID*), rastreável na plataforma *Cellosaurus* (<https://web.expasy.org/cellosaurus>) (BAIROCH, 2018).

Previamente aos experimentos todas as linhagens celulares são devidamente revalidadas quanto à autenticidade genética por meio de análise de repetições curtas em tandem (*Short tandem Repeats – STRs*) e certificadas como livres de contaminação por *Mycoplasma sp* empregando os procedimentos de rotina em estudos conduzidos pelo ViriCan.

As linhagens linfoides apresentadas no Quadro 1 e as linhagens Jurkat e THP-1, foram cultivadas em suspensão com o meio de cultivo RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum -FBS*), acrescidos de 0,4% de gentamicina para controle microbiológico. As linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas com meio DMEM, 10% de FBS e 0,4% de gentamicina. A linhagem PC-3 foi cultivada com meio RPMI, 10% de SFB e 0,4% de penicilina/estreptomicina. A linhagem SaOS-2 foi cultivada com meio McCoy, 10% de soro fetal bovino e 0,4% de penicilina/estreptomicina. A linhagem NP69 foi cultivada com meio

Defined Keratinocyte SFM (IX) (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), 10% de FBS e 0,4% de gentamicina. Todas as linhagens foram cultivadas com incubação a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Regularmente as células foram submetidas a subcultivo e monitoramento da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do corante azul de tripan e análise morfológica em microscópio óptico invertido.

5.2 Análise de expressão de moléculas de *checkpoint* imunológico

Foi gerado um painel de moléculas selecionadas envolvidas em *checkpoints* imunológicos para análise de expressão gênica empregando qPCR. As moléculas que constituem o painel estão listadas no Quadro 3.

Quadro 3 - Listagem dos potenciais alvos em estudo para constituir painel de análise da expressão de moléculas com papel em checkpoints imunológicos potencialmente relevantes para a linfomagenese

Proteína (Gene - GenelD ¹)	Propriedades
B7-H3 (CD276 - 80381)	Expressa em múltiplos tecidos, principalmente placenta e vesícula biliar. Associada a pior prognóstico para vários cânceres humanos (NIRSCHL; DRAKE, 2013).
B7-H4 (VTCN1 - 79679)	Transcrito expresso em diversos tecidos, mas proteína tem expressão limitada à superfície da célula. Associada a progressão de tumores e pior prognóstico para diversos cânceres (PODOJIL; MILLER, 2017; ZHANG et al., 2013).
BTLA (CD272 - 151888)	Expressa em linfócitos T e B, células dendríticas e outras células linfoides. Liga-se ao receptor HVEM. Associado a cânceres e doenças autoimunes (MURPHY; NELSON; ŠEDÝ, 2006)
CTLA-4 (CD152 - 1493)	Expressa especialmente em linfócitos T reguladores. Sinais inibitórios agrega ao desenvolvimento de doenças autoimunes e progressão tumoral (WALKER; SANSOM, 2011)
LAG-3 (CD223 - 3902)	Expressa em linfócitos T, NK e TILs. Co-expressão com PD-1 refreia resposta mediada por linfócitos T em infecções crônicas e câncer (ANDREWS et al., 2017).
PD-L1 (CD274 - 29126)	Expressa em diversas células hematopoiéticas e endoteliais. Hiperexpressa no microambiente tumoral. Associada a pior prognóstico para diversos cânceres: a interações com PD-1 promove sinais de sobrevivência para células tumorais e perda da função efetora dos linfócitos T (SUN; MEZZADRA; SCHUMACHER, 2018).
PD-L2 (PDCD1LG2 - 80380)	Expressão mais abundante em células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Hiperexpressa em infecções crônicas e cânceres (SHARPE; PAUKEN, 2018).
TIM-3 (HAVCR2 - 84868)	Expressa em linfócitos T e TILs. Expressão favorece papel inibidor em imunidade antitumoral (GRAVELLE et al., 2016, p. 3).
VISTA (VSIR - 64115)	Expressa predominantemente em células hematopoiéticas. Suprime ativação dos linfócitos T, favorecendo progressão de tumores (BÖGER et al., 2017)

¹ Código de acesso na base de dados *Gene* dos Centro de Informações Biotecnológicas dos EUA (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*). ² Sequência de referência do transcrito identificada na base de dados Genbank, do NCBI

Em síntese, células de linhagens selecionadas, cultivadas conforme previamente indicado, foram submetidas a extração de RNA total com o reagente *TRIzol*[®] (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), seguindo instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria UV em equipamento *NanoDrop*[™] 1000 (ThermoFisher) e armazenado em freezer a -80°C até o uso oportuno. Subsequentemente as amostras de RNA total foram submetidas a eliminação de DNA contaminante por incubação com DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 15 min em temperatura ambiente, seguida de inativação enzimática a 70°C por 10min, de acordo com as instruções do fabricante. A produção de cDNA foi efetuada com a enzima transcriptase reversa *SuperScript*[®] IV (ThermoFisher) em reações com volume final de 20µL, compostas de 0,3µg/µl de iniciadores arbitrários, 0,5mM de dNTPs, 500ng de RNA total, tampão de reação *SuperScript* 1x, 10mM DTT, 2U de inibidor recombinante de RNase e 200U da enzima. As reações foram executadas em termociclador com incubação inicial a 65°C por 5min, seguida de 23°C - 10min, 55°C -10min, e 80°C -10min. A identificação dos níveis de expressão dos transcritos de interesse foi efetuada por qPCR empregando o agente intercalante *SybrGreen* com reagentes *GoTaq*[®] *qPCR Master Mix* (Promega, Madison, WI, USA). Os iniciadores utilizados nas reações foram obtidos na literatura ou desenhados pelos autores, tendo por subsídio anotação (vide Anexos) para confirmação das regiões de anelamento dos iniciadores sense e antisense, potencial de formação de dímeros e outras estruturas indesejáveis, bem como os tamanhos de amplicons esperados após amplificação por qPCR. As sequências dos transcritos para os genes selecionados foram extraídas da base de dados *Genbank*, do Centro de Informações Biotecnológicas dos EUA (*National Centers for Biotechnology Information* – NCBI; Bethesda, MD, EUA). Subsequentemente foi realizada a seleção das sequencias dos iniciadores com auxílio da ferramenta online *Primer Blast* (NCBI) e os softwares *OligoExplorer* v.1.1 e *OligoAnalyzer* v.1.2 (ambos *GeneLink* Inc., Orlando, FL, EUA).

Com exceção dos iniciadores para o alvo B7-H4, cujas sequências foram obtidas de artigo publicado na literatura (CHE et al., 2017, p. 7), os oligonucleotídeos iniciadores remanescentes utilizados nos experimentos foram desenhados de modo a atender os critérios a seguir: 1) tamanho entre 19-22 pb; 2) produto final (amplicon) com 90-200 pb; 3) conteúdo de GC de aproximadamente 50%; 4) energia livre de Gibbs (ΔG) superior a -5 para qualquer estrutura secundária predita; e 5) iniciadores ocupando preferencialmente junções exon/exon do transcrito para o gene-alvo, ou iniciadores sense e antisense ocupando exons distintos adjacentes. Adicionalmente, buscou-se que todas as sequências de oligonucleotídeos iniciadores fossem desenhadas em regiões conservadas dos transcritos de seus respectivos

genes-alvo, possibilitando amplificação de diferentes variantes já descritas do RNAm (vide Apêndice II). Iniciadores considerados apropriados e selecionados para os experimentos (apresentados no Quadro S1) foram encaminhados para síntese em serviço especializado oferecido pelas empresas Sigma-Aldrich e Thermo Fisher Scientific do Brasil.

As condições ideais de qPCR foram otimizadas partindo-se de condições genéricas, dadas por reação composta por 5,0µl de mix de qPCR *GoTaq® qPCR Master Mix*, 0,30 µM de cada iniciador e 200 ng de cDNA, e programa de termociclagem de 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15s, 60°C por 60s e finalização com rampa de temperatura de 55°C à 99°C, para análise de curva de dissociação dos amplicons. Os experimentos de qPCR para padronização dos iniciadores foram executados em equipamento termociclador Rotor Gene Q (Qiagen) (com exceção do experimento de eficiência do alvo CTLA-4), os demais experimentos de qPCR e experimento de eficiência do alvo CTLA-4 foram realizados em equipamento termociclador AriaMX (Agilent Tech., Boeblingen, BW, Germany). A expressão diferencial dos transcritos para cada linhagem celular/condição avaliada foi estimada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (RAO et al., 2013), tendo por base a expressão constitutiva dos genes codificadores de proteína ribossomal 18S (*Ribossomal Protein S18 – 18s*), proteína ribossomal 13S (*Ribossomal Protein S13 - RPS13*), Hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase (*Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase – HPRT*) ou da proteína de choque térmico citossólica alfa 90kDa (*Heat Shock Protein Cytosolic 90 Alfa B - HSPCB*) (JACOB et al., 2013).

5.3 Repressão de EBV LMP1 e RPMS1 por RNAi

Uma vez que células linfoides tipicamente são refratárias a métodos de transfecção baseados em carreadores lipídicos, iniciamos avaliação da possibilidade de inibição (*knock-down*) da expressão de RPMS1 e LMP1 do EBV empregando eletroporação com sistema Neon (ThermoFisher). Ainda, na expectativa de obter melhores eficiências de transfecção, foi utilizado DMSO, conforme indicado por Fyrberg e Lofti (FYRBERG; LOTFI, 2010). A linhagem Jiyoye foi utilizada inicialmente em virtude de existência de um protocolo de eletroporação com o sistema Neon para essa linhagem recomendado pelo fabricante do equipamento. Os experimentos preliminares de padronização foram efetuados com controle de transfecção BLOCK-iT Alexa Fluor (ThermoFisher) na concentração final de 20nM. Adicionalmente, foram utilizados três parâmetros de eletroporação (1,400 v, 20ms, 1 pulso; 1,600v, 20ms, 1 pulso; 1,600v, 10ms, 3 pulsos) baseados nos parâmetros pré-padronizados para a linhagem. Para o tratamento de linhagens celulares constitutivamente infectadas pelo EBV e

com expressão verificada de RPMS1 já foram obtidos dsRNAs dirigidos ao transcrito de EBV RPMS1, sintetizados pela empresa IDT (Newark, NJ, EUA): dsRNARPMS1_1 (*Sense*: GCA GGA UAU CUG CAG GAU CAG GUC e *Antisense*: UGC GUC CUA UAG ACG UCC UAG UCC AGU) e dsRNARPMS1_2 (*Sense*: GAG GAC GCA GGA UAU CUG CAG GAT C e *Antisense*: GUC UCC UGC GUC CUA UAG ACG UCC UAG). Os RNAs longos de dupla fita (*double-stranded RNA* –dsRNA) são degradados pela enzima Dicer em siRNAs, que geralmente têm de 21-23 pares de bases (pb). Em mamíferos, o siRNA associa-se com a Dicer, TRBP e Argonaute 2 (Ago2) para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced silencing complex* - RISC). Uma vez no RISC, uma fita do siRNA, a fita passageira (*sense*), é degradada ou descartada enquanto que a fita guia (*antisense*) direciona a clivagem do RNA alvo (CHENDRIMADA et al., 2005). Os dsRNAs (IDT) que são dsRNAs de 27 pb têm uma potência de RNAi aumentada quando comparados aos siRNAs convencionais. Este desenho mais longo favorece o processamento da Dicer e o carregamento da fita antisense no RISC, resultando em aumento da clivagem do mRNA (ROSE et al., 2005).

5.4 Expressão de EBV LMP1 e RPMS1 em células EBV negativas

O vetor utilizado para a expressão de EBV LMP1 do isolado viral B95.8 foi o pZsGLMP1_B95-8, previamente produzido em outro trabalho do Grupo de Estudos em Carcinogênese Viral e Biologia dos Cânceres (ViriCan) (MÜLLER-COAN, 2016), tendo como vetor-base (*backbone*) comercial pEF1 α -IRES-ZsGreen1 (Clontech, Mountain View, CA, USA), doravante denominado pZsGreen. O vetor utilizado para a expressão de EBV RPMS1 foi o pcDNARPMS1, que foi gentilmente cedido pelo grupo liderado pelo Prof. Paul J. Farrell, do Departamento de Virologia do Imperial College em Londres, Inglaterra, tendo como vetor-base pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen, Califórnia,

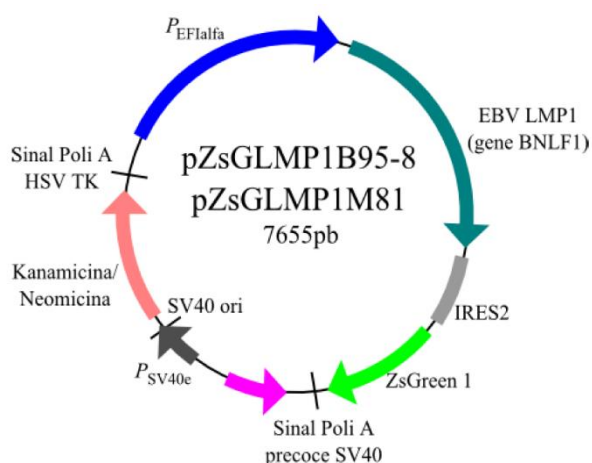


Figura 4 - Mapa dos construtos gerados com o gene BNLF1 do EBV, codificador da oncoproteína viral LMP1 (MÜLLER-COAN, 2016).

EUA). A transfecção dos vetores de EBV LMP1 e RPMS1 em linhagem Ramos, de linfoma de Burkitt EBV negativa, foi realizada empregando eletroporação (1,300v 20ms, 2 pulsos) com sistema Neon (ThermoFisher). A transfecção dos vetores em células epiteliais de nasofaringe

NP69^{SV40T} foi realizada por carreador lipídico *Lipofectamine* 3000 (ThermoFisher) seguindo protocolo indicado pelo fabricante. A análise das taxas de transfecção foram feitas, no caso dos vetores de EBV LMP1, verificando o percentual de células que expressavam o GFP, que indicaria a presença do vetor na célula. Os vetores de RPMS1 não possuem fluorescência, portanto a transfecção foi validada por experimentos de qPCR. Células observadas em microscópio invertido com contraste de fase Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA).

5.5 Análise dos resultados

Os vetores pZsGLMP1_B95-8 e pcDNARPMS1 foram empregados para transfecção transiente da linhagem de linfoma EBV-negativo Ramos, modelo no qual os possíveis efeitos da expressão ectópica de EBV LMP1 e RPMS1 na expressão de transcritos de moléculas associadas a *checkpoints* imunológicos: B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, TIM-3 e VISTA. Os dados obtidos apresentaram distribuição normal (teste de normalidade Shapiro-Wilk). Assim sendo, os resultados de expressão gênica foram avaliados pelo teste paramétrico t de Student pareado, empregando nível de significância $p \leq 0,05$ e intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas e gráficos foram feitos empregando o software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

6. Resultados

6.1 Validação dos iniciadores

Todos os pares de iniciadores foram submetidos a validação experimental para análises de especificidade e eficiência de amplificação dos segmentos esperados para os respectivos transcritos-alvo. Foi efetuado escrutínio das linhagens celulares disponíveis (Quadros 1 e 2) para identificação daquelas que pudessem ser empregadas como controles positivos adequados à análise de expressão das moléculas de interesse. O Quadro 4 sintetiza os resultados obtidos da análise da expressão das moléculas selecionadas de *checkpoints* imunológicos nas linhagens celulares indicadas. A Figura 5 mostra os produtos amplificados por PCR com os esperados pesos moleculares.

Quadro 4 - Linhagens celulares empregadas para padronização dos iniciadores de genes de checkpoint imunológico

Linhagem	Moléculas avaliadas	Resultado
BC-1	CTLA-4, LAG-3	EBV Lat I ¹ . Padronização CTLA-4. Não houve expressão de LAG-3 ²
IBL-1	BTLA, CTLA-4, LAG-3	EBV Lat II/III ¹ . Não houve expressão de CTLA-4 e LAG-3 ²
Jiyoye	CTLA-4, LAG-3	EBV Lat I ¹ . Não houve expressão de CTLA-4 e LAG-3 ²
Jurkatt	BTLA, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, VISTA	Expressa Tim-3 e VISTA. Não houve expressão de CTLA-4 e LAG-3 ²
MCF-7	B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, LAG-3, TIM-3	Padronização B7-H3 e B7-H4. Baixa expressão de TIM-3. Não houve expressão de BTLA, CTLA-4 e LAG-3 ²
MDA-MB-231	BTLA, CTLA-4, LAG-3	Não houve expressão de BTLA, CTLA-4 e LAG-3 ²
NP69^{SV40T}	BTLA, CTLA-4, LAG-3, PD-L1	Padronização PD-L1. Não houve expressão de CTLA-4 e LAG-3 ²
PC-3	CTLA-4, LAG-3	Não houve expressão de CTLA-4 e LAG-3 ²
RAEL	BTLA, CTLA-4, LAG-3	EBV Lat I ¹ . Padronização BTLA. Não houve expressão de CTLA-4 e LAG-3 ²
SaOS-2	CTLA-4, LAG-3	Não houve expressão de CTLA-4 e LAG-3 ²
THP-1	BTLA, CTLA-4, LAG-3, PD-L2, TIM-3, VISTA	Padronização PD-L2, TIM-3 e VISTA. Baixa expressão de BTLA. Não houve expressão de CTLA-4 e LAG-3 ²

(¹)EBV: situação de infecção pelo EBV (Lat. - programas de latência I, II ou III); ² A linhagem celular não exibiu expressão suficiente das moléculas avaliadas de *checkpoints* imunológicos, de modo que não foi selecionada para uso em experimentos subsequentes.

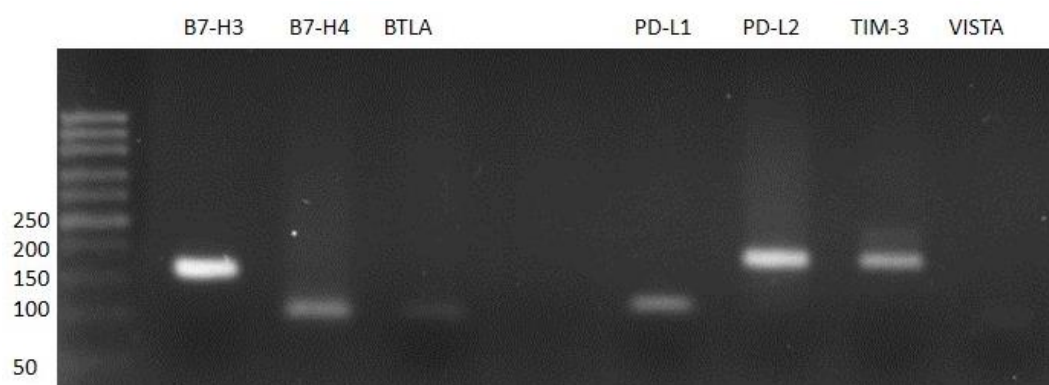


Figura 5 - Validação de iniciadores de PCR para análise de expressão de moléculas selecionadas de checkpoints imunológicos em nível transcricional. As linhagens celulares utilizadas para os alvos são: MCF-7 para B7-H3 (164 pb) e B7-H4 (100 pb); Rael para BTLA (97 pb); NP69 para PD-L1 (114 pb); e THP-1 para PD-L2 (190 pb), TIM-3 (189 pb) e VISTA (90 pb). Produto de PCR avaliado em gel de agarose 2% corado com corante intercalante *Brilliant Green*.

Confirmada a amplificação dos alvos por PCR convencional, procedeu-se a determinação da eficiência de amplificação por qPCR de cada par de iniciadores em uso. Para tanto, foi efetuada curva com diferentes concentrações do cDNA das amostras-teste por meio de diluições seriadas. A Tabela 1 apresenta eficiência de amplificação atingida para cada alvo e detalhes da diluição seriada. Os gráficos de amplificação obtidos com as amostras de diluição seriada preparadas para cada um dos genes alvos, o valor R^2 calculado para a reação e as curvas de dissociação dos amplicons estão apresentados na Figura S1 do material suplementar. Esses experimentos foram realizados com as condições de reação e de termociclagem previamente descritas (vide seção 4.2) e empregando duplicatas técnicas.

Tabela 1 - Parâmetros e resultados da análise da eficiência de amplificação estimada para os iniciadores utilizados nos experimentos de qPCR para avaliação de genes codificadores de proteínas regulatórias de *checkpoints* imunológicos.

Alvo	Diluição	Concentrações (ng/mL) ¹	Slope ²	Eficiência ³
B7-H3	1:5	4, 20, 100, 500	-3,2	1,01
B7-H4	1:2	40, 80, 160	-3,3	1,00
BTLA	1:3	3, 11, 33, 100	-2,8	1,23
CTLA-4	1:3	32, 97, 293, 880	-3,4	0,94
PD-L1	1:2	25, 50, 100, 200	-3,1	1,08
PD-L2	1:3	18, 55, 166, 500	-3,5	0,92
TIM-3	1:3	18, 55, 166, 500	-3,40	0,96
VISTA	1:10	3, 30, 300	-3,5	0,93

¹ Faixa de concentrações de cDNA total utilizada para estimativa da eficiência de amplificação por qPCR dos alvos indicados; ² *Slope* calculado com base nos CTs alcançados em diferentes concentrações; ³ Eficiência de amplificação calculada pela fórmula ($* = 10^{(-1/m)} - 1$). Para alvos B7-H4 e VISTA um ponto de diluição foi retirado afim de obter melhores resultados de eficiência.

6.2 Painel de expressão de transcritos de moléculas de *checkpoints* imunológico

Com os iniciadores padronizados e apresentando bons parâmetros de eficiência, foram sintetizados cDNA das linhagens de linfomas constitutivamente infectadas pelo EBV e realizado qPCR para a detecção de expressão de transcrito dos alvos de moléculas de *checkpoint* imunológico. Os resultados obtidos com três experimentos independentes (triplicata biológica) e única replicata técnica estão representados na figura 6. Com exceção de B7-H4, todos os alvos tiveram expressão em pelo menos uma das linhagens linfoides testadas. A última linhagem dos gráficos foi utilizada como controle de expressão do alvo indicado, enquanto que a primeira linhagem dos gráficos foi a que apresentou menor nível de expressão dos alvos e foi utilizada como referência.

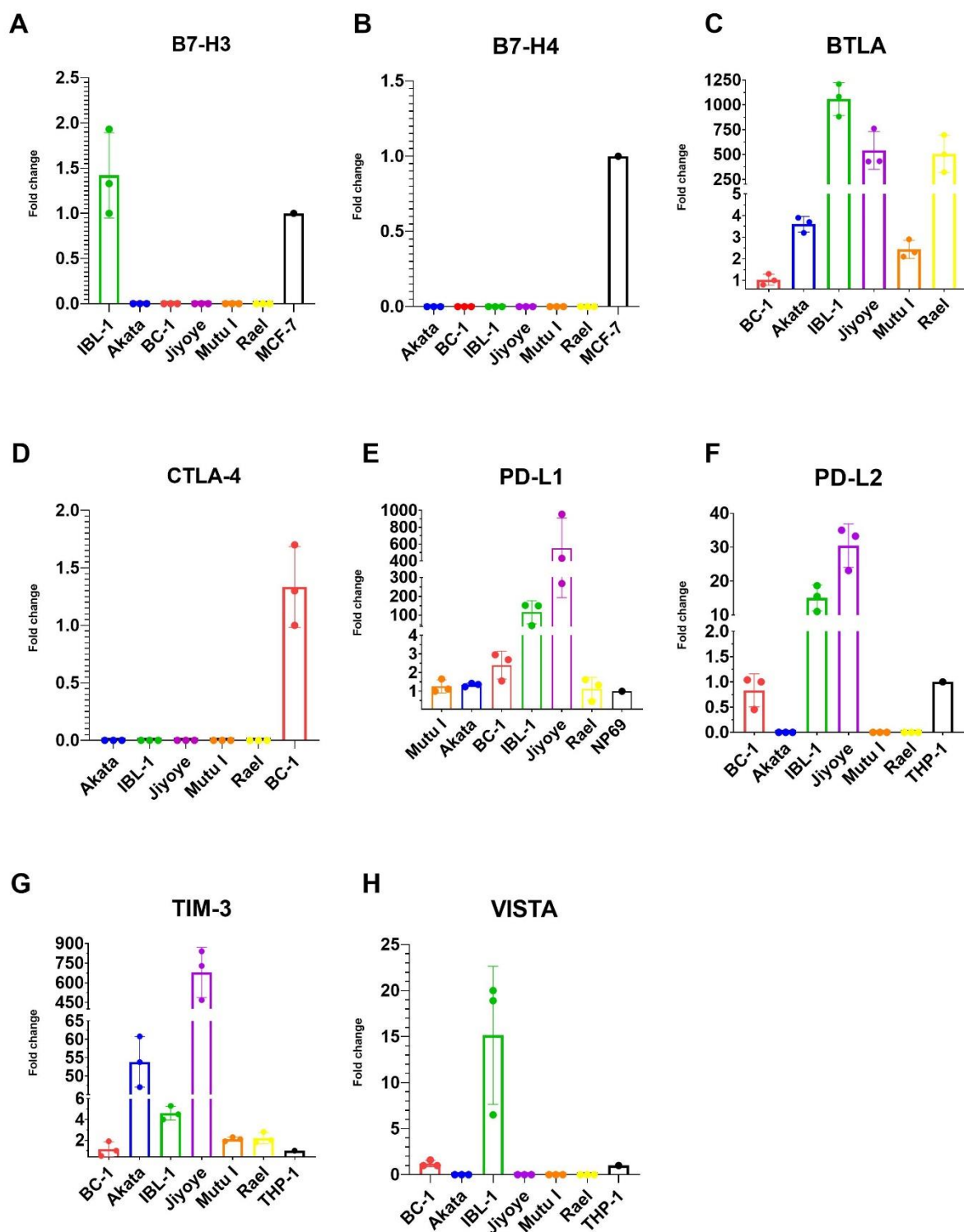


Figura 6 - Painel de expressão de transcritos de moléculas associadas a *checkpoints* imunológicos em linhagens linfoides *in vitro* constitutivamente infectadas pelo EBV. Foram empregados 200ng/ μ L de cDNA de amostra para cada replicata biológica. Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de *RPS18* e *HSP90*. Linhagens utilizadas como controle de expressão: MCF-7 para B7-H3 (A) e B7-H4 (B); Rael para BTLA (C); BC-1 para CTLA-4 (D); NP69 para PD-L1 (E); e THP-1 para PD-L2 (F), TIM-3 (G) e VISTA (H). A) Apenas linhagem IBL-1 expressou B7-H3. B) Nenhuma das linhagens expressou B7-H4. C) Todas as linhagens expressaram BTLA

(Referência da expressão diferencial: BC-1). D) Apenas linhagem BC-1 expressou CTLA-4. E) Todas as linhagens expressaram PD-L1 (Referência da expressão diferencial: Mutu I). F) As linhagens BC-1, IBL-1 e Jiyoye expressaram PD-L2 (Referência da expressão diferencial: BC-1). G) Todas as linhagens expressaram TIM-3 (Referência da expressão diferencial: BC-1). H) As linhagens BC-1 e IBL-1 expressaram VISTA (Referência da expressão diferencial: BC-1).

6.3 Repressão de EBV LMP1 e RPMS1 por dsRNA

A Tabela 2 apresenta os resultados das taxas de transfecção e viabilidade das células transfectadas utilizando sistema de eletroporação Neon (ThermoFisher), nas diferentes condições listadas, utilizando a linhagem Jiyoye e BLOCK-iT (ThermoFisher) como controle de transfecção. A Figura 7 mostra células transfectadas identificadas pela emissão de fluorescência vermelha pelo controle de transfecção (eletroporação: 1,400v, 20ms, 2 pulsos). As taxas de viabilidade e transfecção foram calculados por contador automático Countess II (ThermoFisher).

Tabela 2 - Condições de eletroporação empregadas com sistema Neon e resultados de transfecção de linhagem Jiyoye utilizando controle de transfecção BLOCK-iT.

Voltagem (v)¹	Tempo (ms)²	Pulsos³	Eficiência*	Viabilidade*
1.600	10	3	32%	64%
1.600	20	1	35%	62%
1.400	20	2	43%	61%

¹ Voltagem de pulso; ² largura de pulso em milissegundos; ³ Quantidade de pulsos; * Taxa de transfecção e viabilidade calculado por contador automático Countess II (ThermoFisher)

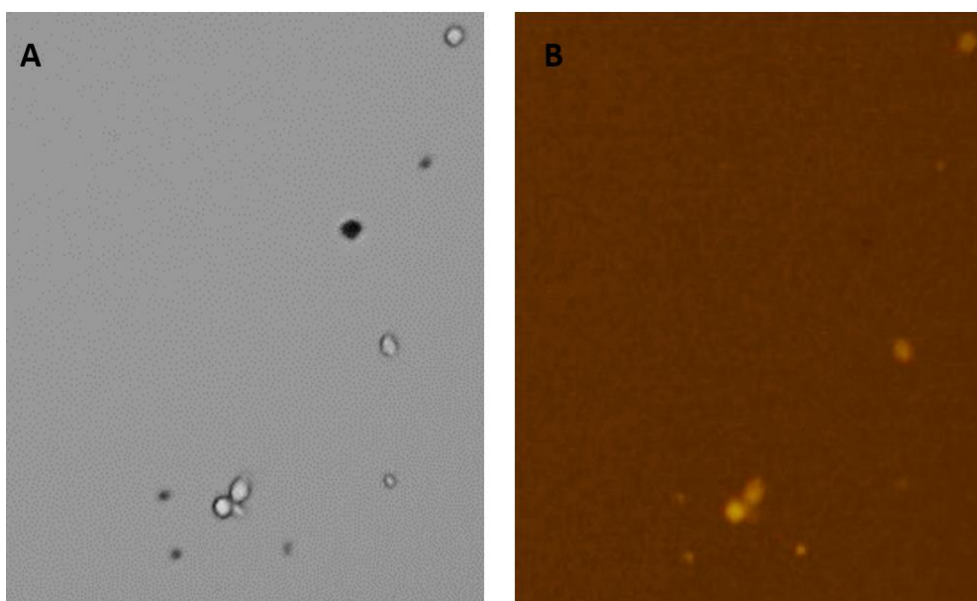


Figura 7 - Células Jiyoye transfectadas com sistema de eletroporação Neon™ (1,400v, 20ms, 2 pulsos) e 20nM de RNA BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Control. Em 24h pós-transfecção as células foram analisadas com azul de trypan por microscopia de contraste de fase (A) e por fluorescência em contador automático Countess II (ThermoFisher) (B).

Identificada as melhores condições de eficiência de transfecção, seguiram-se experimentos com dsiRNAs dirigidos ao gene endógeno humano *HPRT* e EBV *RPMS1*, conforme os parâmetros de eletroporação detalhados na figura 7 (1,400v, 20ms, 2 pulsos), visto que foi obtido melhores taxas de transfecção. A figura 8 A mostra boa obtenção de knock-down para o gene *HPRT* 24h após a transfecção. Para o gene de EBV *RPMS1* foram testadas diferentes concentrações de ambos dsiRNAs específicos sintetizados (detalhados na seção 4.3). Os resultados apresentados na Figura 8 indicaram níveis de expressão inconsistentes com as crescentes concentrações de dsiRNA empregados para inibição da expressão de EBV *RPMS1*.

Devido aos resultados inconsistentes de repressão de EBV *RPMS1* empregando a estratégia de RNAi com dsiRNAs, optou-se por modificar a estratégia de análise dos efeitos das proteínas virais em investigação na expressão das moléculas que compõem o painel de qPCR de reguladores de *checkpoints* imunológicos. Para tanto os experimentos subsequentes empregaram modelos de células sem infecção pelo EBV transientemente transfectadas com vetores recombinantes para expressão ectópica e constitutiva das proteínas virais LMP1 e *RPMS1*.

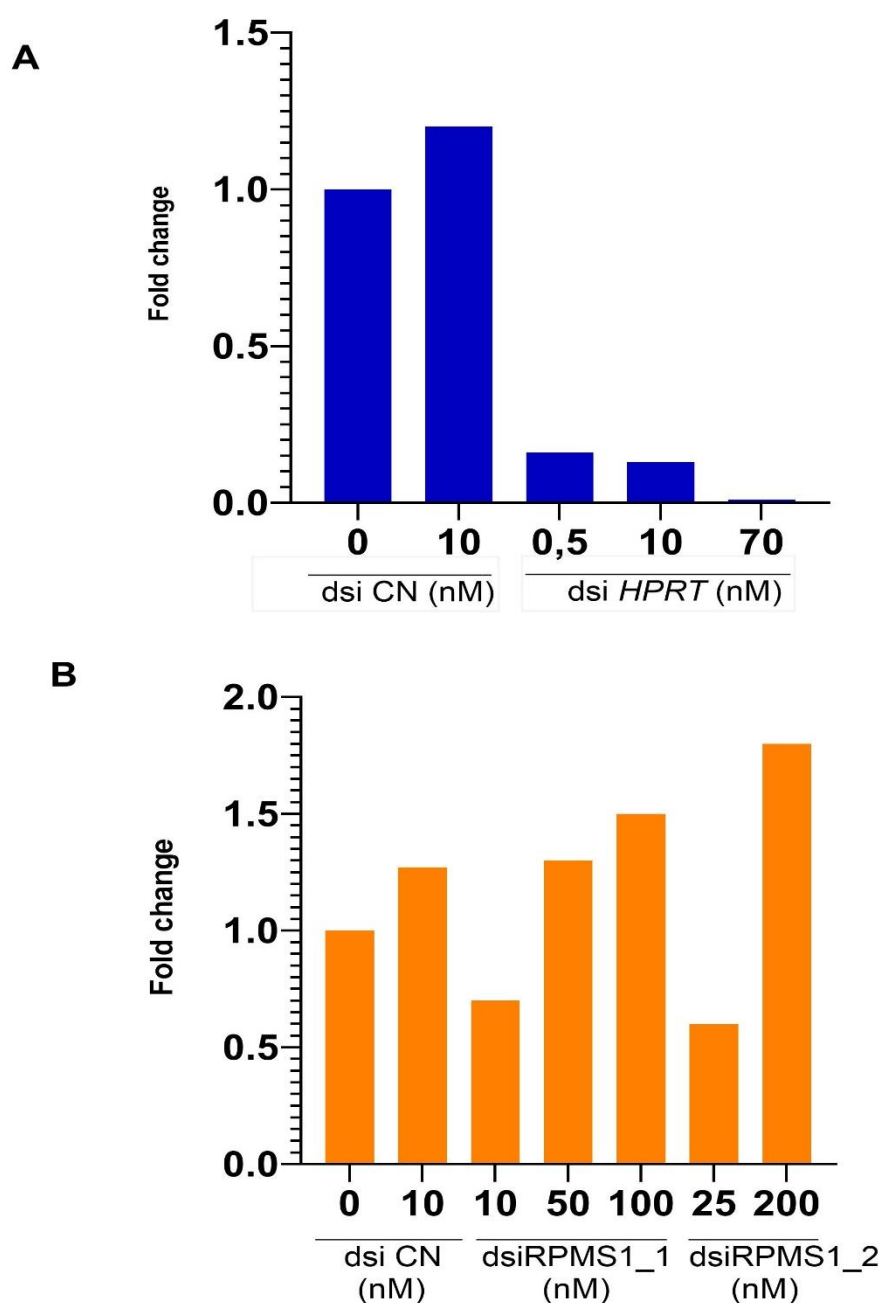


Figura 8 – Células Jiyoye avaliadas 24h após eletroporação e transfectadas com dsiRNAs. Resultados de análise por qPCR. A) Expressão do gene humano *HPRT* em nível transcricional na linhagem linfoide Jiyoye eletroporada sem dsiRNA, com dsiRNA controle negativo (CN) a 10nM e com dsiRNA específico para o alvo *HPRT* em concentrações de 0,5nM, 10nM e 70nM. Normalização pela média dos níveis de expressão transcricional dos controles endógenos *RPS18* e *HSP90*. B) Expressão de *RPMS1* em linhagem linfoide Jiyoye eletroporada sem dsiRNA, com 10nM de dsiRNA CN e com dsiRNAs específicos para *RPMS1* em concentrações de 10nM, 50nM e 100nM para o *dsiRPMS1_1*; e 25nM e 200nM para o *dsiRPMS1_2*. Normalização pela média dos níveis de expressão transcricional dos controles endógenos *RPS13* e *HPRT*.

6.4 Expressão de EBV LMP1 e RPMS1 em células transfectadas transientemente

A linhagem Ramos (linfoma de Burkitt EBV-negativo; RRID:CVCL_0597), cedida pela Profa. Dra. Ethel Cesarman, da Universidade de Cornell, foi selecionada para seguimento dos experimentos com expressão ectópica isolada das proteínas virais LMP1 e RPMS1. Diferentes parâmetros de eletroporação utilizando o sistema Neon e vetor PMax-GFP (Amamax-Lonza, Waverly, AUS), que codifica proteína repórter fluorescente verde (GFP), foram testados. Os resultados obtidos estão indicados na Tabela 3; a Figura 9 apresenta imagens representativas das células Ramos transfectadas, emitindo fluorescência relacionada à proteína repórter GFP.

Tabela 3 - Condições de eletroporação empregadas com sistema Neon e resultados de transfecção de linhagem Ramos utilizando controle de transfecção PMax-GFP.

Voltagem (v)¹	Tempo (ms)²	Pulsos³	Eficiência*	Viabilidade*
1.350	30	1	45%	58%
1.350	20	2	53%	51%
1.350	10	3	52%	64%
1.550	20	1	64%	62%
1.550	10	3	17%	45%

¹ Voltagem de pulso; ² largura de pulso em milissegundos; ³ Quantidade de pulsos; * Taxa de transfecção e viabilidade calculado por contador automático Countess II (ThermoFisher)

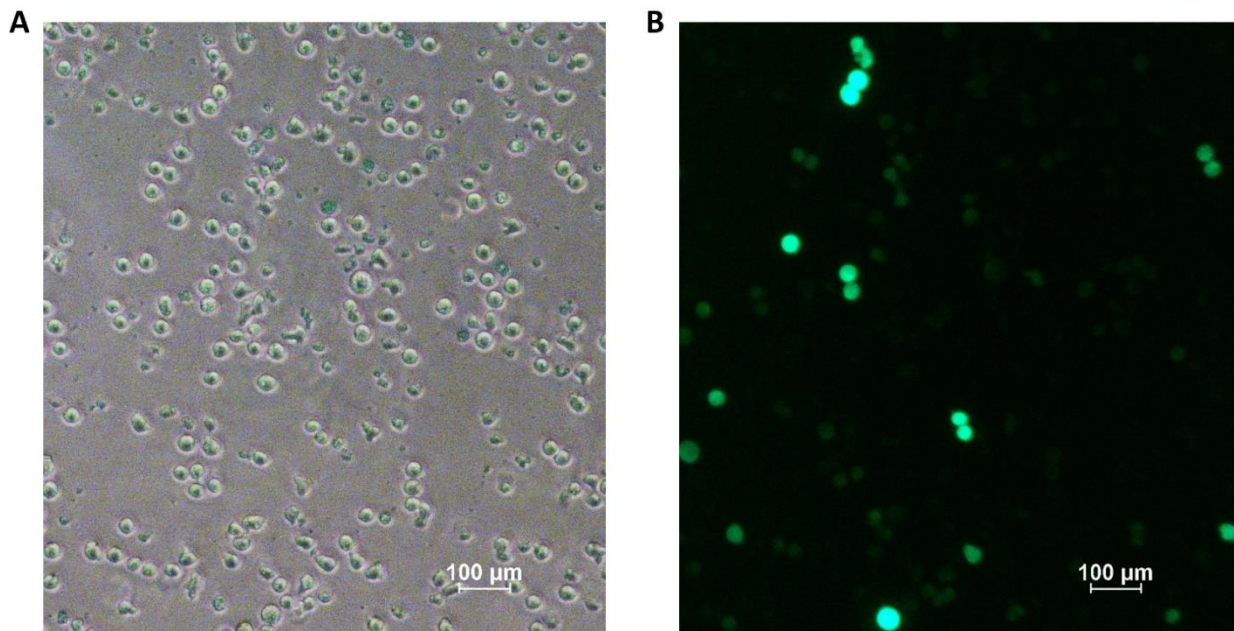


Figura 9 - Células Ramos transfectadas utilizando Sistema de eletroporação Neon™ e 500ng de vetor PMax-GFP (Amaxa). 24h pós transfecção, as células foram analisadas por microscopia de luz (A) e fluorescência (B). Aumento final de 400x.

Os experimentos subsequentes empregaram a condição que proporcionou as melhores taxas de transfecção e viabilidade (1.550v, 20ms, 1 pulso), inicialmente com 1µg dos vetores base pEF1α-IRES-ZsGreen1 (Clontech) e do vetor recombinante pZsGLMP1_B958 (Muller-Coan, 2016), ambos apropriados para o monitoramento das eficiências de transfecção pela expressão constitutiva da proteína repórter verde ZsGreen. Em experimento piloto, apresentado na Figura 10, foi observado morte celular considerável e ausência de células emitindo fluorescência para células tratadas e não tratadas com vetor de EBV LMP1.

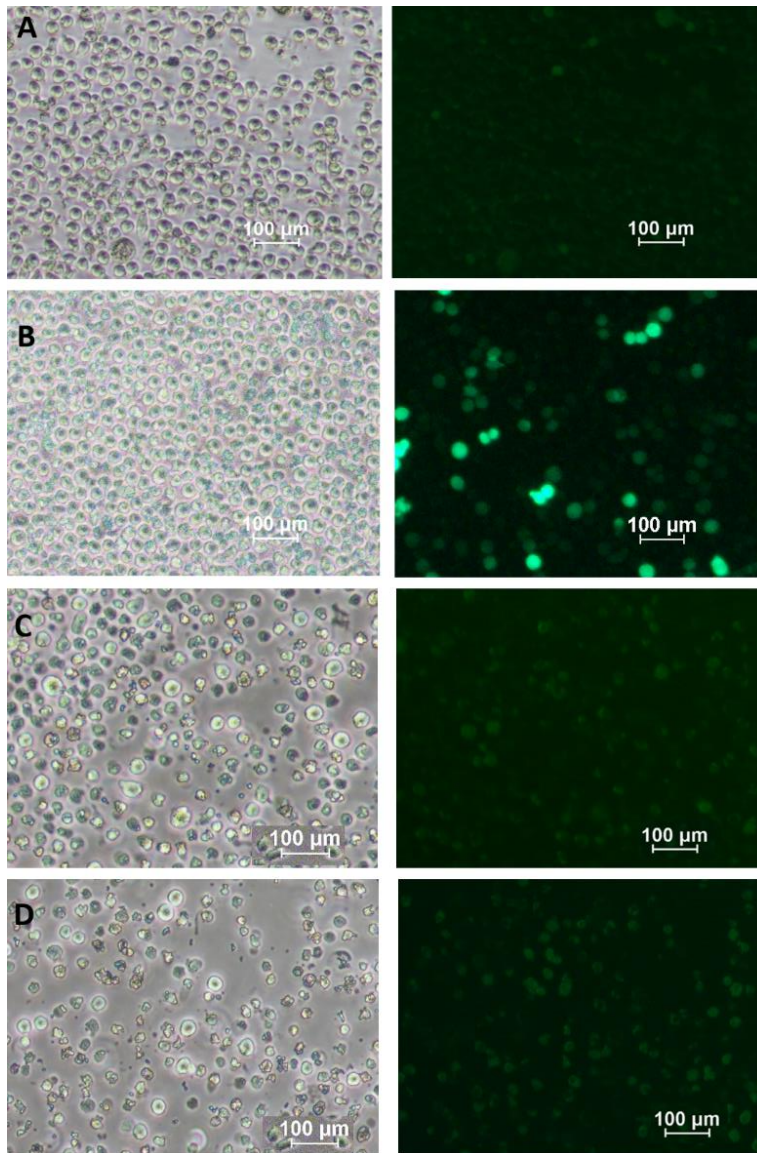


Figura 10 - Células Ramos em 24h pós transfecção transfectadas utilizando Sistema de eletroporação Neon™. Imagens de microscopia ótica de contraste de fase (à esquerda) e fluorescência (à direita). A) Células transfectadas sem vetor. B) Células transfectadas com 1μg do vetor repórter PMax-GFP (Amaxa) C) Células transfectadas com 1μg de vetor-base pEF1α-IRES-ZsGreen1 (Clontech); Nota-se aumento de morte celular e ausencia de fluorescência. D) Células transfectadas com 1μg do vetor recombinante pZsGLMP1_B958 (Muller-Coan, 2016). Nota-se aumento de morte celular, *debris* e ausencia de fluorescência. Magnificação de 400x.

Em novos testes para padronização da transfecção foi então utilizado o vetor pEF1 α -IRES-ZsGreen1 como controle de transfecção; os resultados estão apresentados na Figura 11. Apenas uma das condições de eletroporação testadas (1.300v 20ms 2 pulsos; Figura 11E) ofereceu razoável taxa de transfecção, com cerca de 50% de células transfectadas (contagem manual em hemocitômetro), sendo então utilizada nos experimentos subsequentes de transfecção de vetores EBV LMP1 e RPMS1.

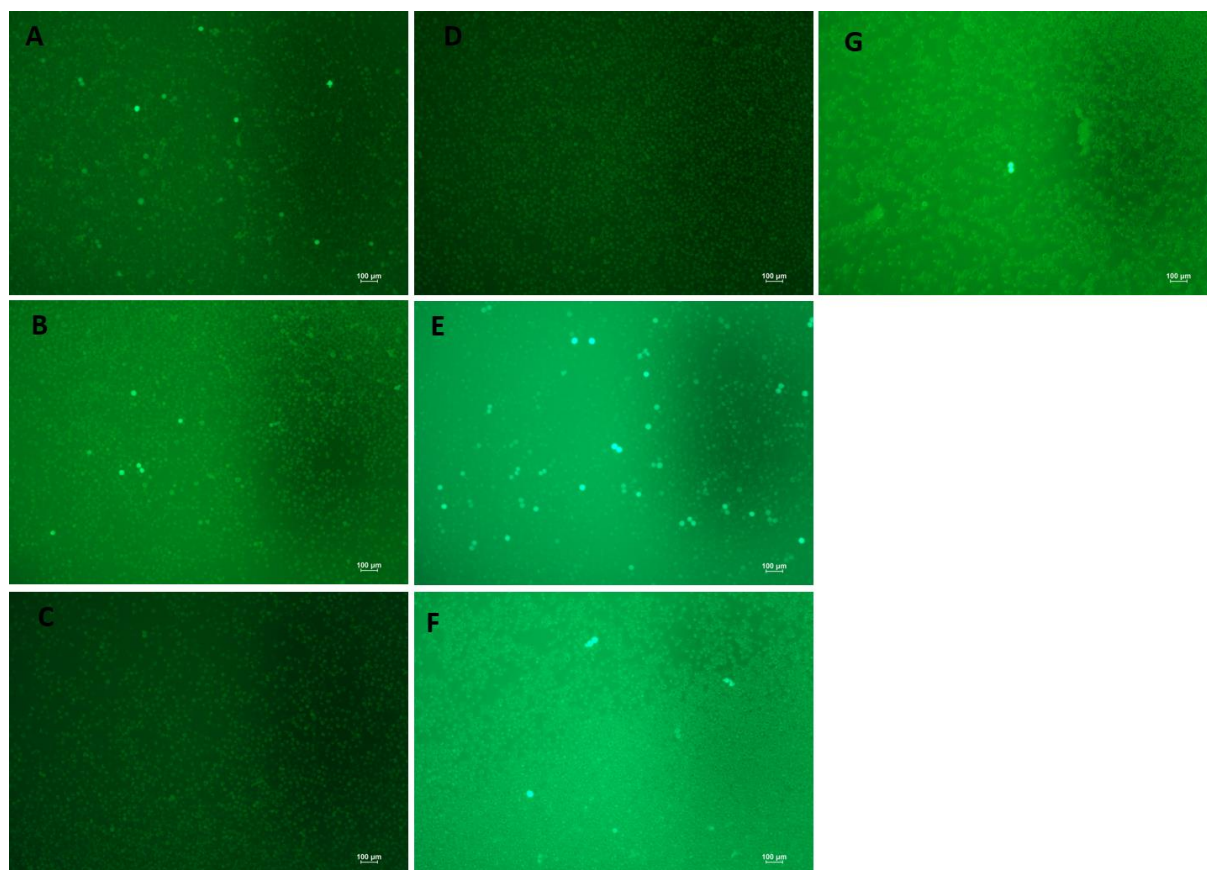


Figura 11 - Células Ramos transfectadas com 1 μ g de vetor pEF1 α -IRES-ZsGreen1 (Clontech) utilizando sistema de eletroporação Neon™ em 24h pós-transfecção A) 1350v 10ms 3x. B) 1350v 30ms 1x. C) 1550v 10ms 3x. D) 1550v 20ms 2x. E) 1300v 20ms 2x. F) 1300v 30ms 1x. G) 1400v 20ms 2x. Análises por fluorescência e magnificação de 400x.

Uma vez determinadas as condições de transfecção, foram efetuados três experimentos independentes (com duplicatas técnicas) de transfecção transiente de células Ramos com 1 μ dos vetores recombinantes para expressão de EBV LMP1 e RPMS1. Em 48h pós-transfecção as células foram submetidas a extração de RNA total, transcrição reversa e avaliação da expressão ectópica dos produtos virais por qPCR. A Figura 12 mostra os resultados obtidos, indicando que as células Ramos transfectadas passaram a expressar os transcritos de EBV

LMP1 e RPMS1 em níveis semelhantes aos observados para células de linhagem Akata constitutivamente infectada pelo EBV, utilizada como controle e referência de expressão dos produtos virais em investigação.

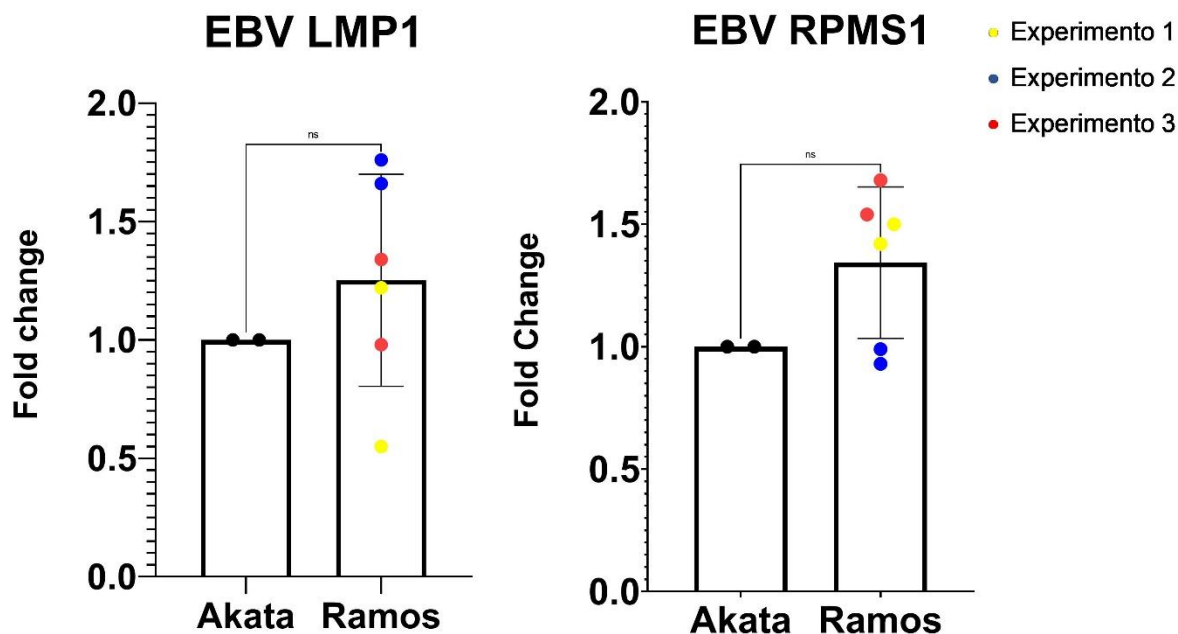


Figura 12 - Células Ramos transfectadas com 1 μ g de vetor pZsGLMP1_B95-8 e pcDNARPMS1 48h após transfecção. Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de *RPS18* e *HSP90*. Linhagem Akata utilizada como controle de expressão de LMP1 e RPMS1.

6.5 Expressão de reguladores de *checkpoints* imunológicos

A Figura 13 apresenta resultados indicando os níveis basais de expressão dos transcritos de genes reguladores de *checkpoints* imunológicos em células Ramos. Esses resultados foram gerados com três experimentos independentes, sem replicatas técnicas.

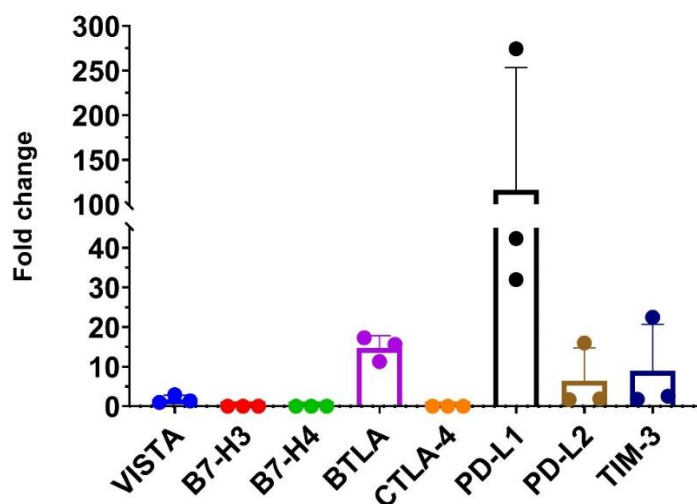


Figura 13 – Níveis basais de expressão em nível transcricional de moléculas de *checkpoint* imunológico em células Ramos avaliadas por qPCR. Normalização pela expressão dos controles endógenos *RPS18* e *HSP90*. VISTA, de menor expressão, é referência (expressão arbitrada em 1).

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos em relação aos níveis de expressão dos transcritos de moléculas de *checkpoints* imunológicos em células Ramos EBV-negativas transfectadas para expressão ectópica de LMP1 e RPMS1 do EBV. Esses experimentos foram realizados em triplicata biológica e duplicata técnica.

Células Ramos expressando EBV LMP1 de modo ectópico apresentaram diminuição da expressão de transcritos para BTLA ($p = 0,002$) e aumento de expressão dos mRNAs de PD-L1 ($p = 0,01$) e TIM-3 ($p = 0,01$). Nos casos das células expressando EBV RPMS1 (vetor pcDNARPMS1), houve aumento da expressão de BTLA ($p = 0,001$) e TIM-3 ($p = 0,006$), mas diminuição da expressão de PD-L1 ($p = 0,01$). Os resultados de expressão diferencial são dados pela expressão relativa entre células em 48h pós-transfecção com os respectivos vetores de expressão para LMP1 e RPMS1 (pZsGLMP1_B95-8 e pcDNARPMS1, respectivamente) comparativamente às células transfectadas com os vetores-base, que não expressam os produtos virais indicados (pEF1 α -IRES-ZsGreen1 e pcDNA3.1/Hygro(+), respectivamente). A estimativa de expressão transcricional de PD-L2 e VISTA por RT-qPCR apresentou a maior variação dentre todos os genes analisados, decorrente de níveis muito baixos de expressão gênica desse alvo, razão pela qual a avaliação desses alvos não foi possível. Para os transcritos de B7-H3, B7-H4 e CTLA-4, a expressão se manteve ausente com as células expressando LMP1 e RPMS1. A figura S2 do Material Suplementar apresenta os gráficos correspondentes aos resultados de expressão diferencial nos três experimentos independentes realizados.

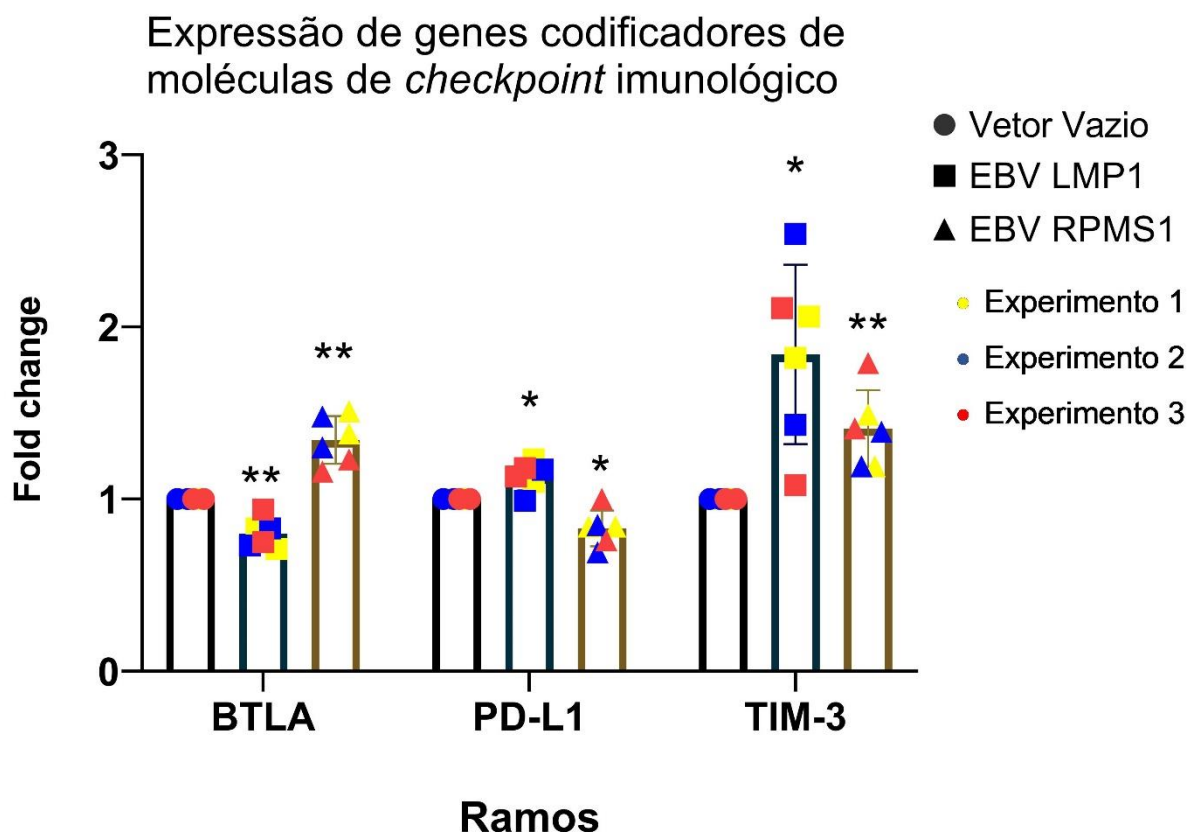


Figura 14 - Expressão diferencial dos transcritos de BTLA, PD-L1 e TIM-3, 48h após transfecção com vetor codificante de EBV LMP1 e RPMS1, comparado a transfecção com vetor vazio. Normalização pela média de expressão dos controlos endógenos humanos *RPS18* e *HSP90* para LMP1; e *RPS13* e *HPRT* para RPMS1. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

Adicionalmente aos ensaios em linhagem de linfoma, foram avaliados as mudanças de expressão dos transcritos de moléculas de *checkpoint* imunológico em linhagem NP69, de células epiteliais de nasofaringe, após transfecção com vetores codificantes de EBV LMP1 e RPMS1, afim de obter mais informações sobre a ação dos produtos virais em células humanas. Para tanto, a linhagem NP69 foi transfectada com 1 μ g de vetores pZsGLMP1_B95-8 e pcDNARPMS1, comparativamente às células transfectadas com os vetores-base pEF1 α -IRES-ZsGreen1 e pcDNA3.1/Hygro(+), respectivamente (Figura S3). Células NP69 expressando EBV LMP1 de modo ectópico apresentaram aumento de expressão dos mRNAs de B7-H3 ($p = 0,007$), PD-L1 ($p = 0,02$) e PD-L2 ($p = 0,0001$). Nos casos das células expressando EBV RPMS1 (vetor pcDNARPMS1), houve aumento da expressão de B7-H3 ($p = 0,01$) e PD-L2 ($p = 0,03$), a expressão de PD-L1 não apresentou diferença significativa ($p = 0,05$) devido a níveis de expressão do transcrito inconsistentes. A expressão dos genes de B7-H4, BTLA, CTLA-4, TIM-3 e VISTA se mantiveram ausente nas células expressando EBV LMP1 e RPMS1. Os resultados estão apresentados na figura S4 do material suplementar.

A tabela suplementar S1 apresenta os valores dos Cts gerados a partir da amplificação por qRT-PCR dos genes de *checkpoint* imunológicos avaliados, nas duas condições experimentais avaliadas, para os três experimentos independentes realizados para cada linhagem celular.

7. Discussão

Checkpoints imunológicos têm papel importante na carcinogênese e progressão tumoral, evidenciando a importância de estudos sobre a ação do EBV na regulação de genes que codificam estas proteínas, especialmente em linhagens linfóides. Embora a literatura apresente alguns dados que relatam a ação da oncoproteína LMP1 do EBV na regulação de genes reguladores de *checkpoints* imunitários (BI et al., 2016, p. 1), essencialmente não há dados sobre um possível papel regulatório exercido pela proteína viral RPMS1. No presente estudo observamos, para células Ramos expressando LMP1, aumento nos níveis transcricionais de PD-L1 e TIM-3 e diminuição de BTLA; para células Ramos expressando RPMS1 foi observado aumento nos níveis transcricionais de BTLA e TIM-3 e diminuição de PD-L1.

A eletroporação na linhagem Ramos se demonstrou bem eficaz nos primeiros ensaios, atingindo boas taxas de transfecção e viabilidade celular quando transfectadas com vetor para expressão isolada da proteína-repórter GFP. Porém, quando transfectadas com os vetores para expressão ectópica de EBV LMP1 e RPMS1, notou-se grandes taxas de morte celular e baixos níveis de transfecção. A LMP1 tem efeitos citotóxicos significativos já documentados para algumas linhagens celulares (BROCQUEVILLE et al., 2013; CHRISTOPHE et al., 2006), o que implica experimentos *in vitro*, causando morte celular e inviabilizando análises, visto que a LMP1 possui capacidade de transformação bem documentada (DIRMEIER et al., 2003). Outra possível causa da morte celular observada pode ser atribuída ao tamanho dos vetores, que possuem mais de 1,000 pb, ou até mesmo que o próprio vetor-base (*backbone*) possa ser tóxico para as células, visto que foi notada morte celular nas células transfectadas com pcDNARPMS1, porém em menor intensidade. Não há dados sobre um possível efeito citotóxico de RPMS1 *in vitro*. Embora tenha sido observada oscilação nas eficiências de transfecção entre os experimentos independentes realizados (principalmente para expressão de EBV LMP1, possivelmente devido a citotoxicidade da própria transfecção ou do transgene), níveis suficientes de expressão dos produtos virais LMP1 e RPMS1 foram obtidos, semelhantes inclusive aos níveis de expressão em células constitutivamente infectadas pelo EBV (Figura 12).

Em relação aos efeitos de EBV LMP1 e RPMS1 na expressão de mRNA de moléculas de *checkpoint* imunológico foi obtido dados semelhantes aos de trabalhos previamente publicados, além de resultados inéditos. Células da linhagem Ramos expressando LMP1 exibiram um aumento significativo dos níveis de PD-L1, o que já havia sido documentado para diversas linhagens celulares (BI et al., 2016, p. 1; FANG et al., 2014). Ademais, células Ramos

expressando LMP1 neste estudo apresentaram diminuição nos níveis transcricionais de BTLA e aumento de TIM-3. Keane et al. (2019) apontaram que a expressão de mRNA de TIM-3 se apresentou mais elevada em amostras de tumor de pacientes com DLBCL associados ao EBV, em comparação aos casos EBV-negativo (KEANE et al., 2019). No mais, não há dados sobre eventual impacto da infecção pelo EBV na expressão de BTLA. Para EBV RPMS1, no presente estudo foi notado um aumento na expressão de transcritos de BTLA e TIM-3, além de diminuição de transcritos de PD-L1 em células Ramos expressando de modo ectópico o gene viral por meio de transfecção transiente. Também não há dados publicados sobre qualquer efeito da RPMS1 na modulação imunitária; assim, este estudo apresenta informações novas acerca de efeitos de EBV RPMS1 com moléculas de *checkpoint* imunológico. Entretanto, é importante destacar que este estudo tem a importante limitação de os efeitos terem sido observados apenas em uma linhagem linfóide, além de que efeitos de RNA circular ou proteína de RPMS1 possam ser diferentes dos de RNAm.

Moléculas reguladoras de *checkpoints* imunológicos têm importância potencial para o manejo clínico de linfomas associados ao EBV, subsidiado em dados de estudos que indicam papel significativo do vírus na regulação destas moléculas (CRISTINO et al., 2019; JIANG et al., 2019, p. 4). Empregando a técnica de imunohistoquímica (*Immunohistochemistry* – IHC), a análise de tecidos de pacientes com DLBCL positivos (n=16) e negativos (n=155) para EBV revelou imunexpressão de B7-H4 em mais de 80% dos casos com infecção pelo EBV e em 78% dos casos EBV-negativos, contrastando com sua hiperexpressão em 54% dos casos positivos para EBV e apenas 7% dos casos sem infecção viral associada (JIANG et al., 2019, p. 4). Esse resultado indica que a infecção por EBV leva ao aumento da expressão de B7-H4, porém o baixo número de amostras EBV+ é uma importante limitação deste estudo.

Um outro estudo analisando linhagens de DLBCL avaliou se miRNAs do EBV poderiam potencialmente ter PD-L1 como alvo. Foi investigado o miR-BHRF1-2-5p viral, selecionado por ter locais de ligação na região 3' UTR de PD-L1 e PD-L2, confirmado por ensaio repórter de luciferase. Linfócitos B *naïve* imortalizados e infectados com o genótipo WIL do EBV foram transfectados com miR-BHRF1-2 e submetidos a análise por citometria de fluxo, que revelou redução significativa das proteínas PD-L1 e PD-L2 nestas células, bem como em linfócitos infectados com o genótipo viral B95-8 (CRISTINO et al., 2019). Nas formas endêmica do BL (eBL) e esporádica (sBL), bem como no BL relacionado a imunodeficiência (idBL), foi relatado que a PD-L1 estava expressa em até 80% dos TAMs (*Tumor-associated macrophages* – TAMs) em amostras de eBL e idBL, enquanto que amostras de sBL, das quais

aproximadamente 70% eram EBV-negativas neste estudo, a PD-L1 esteve expressa em 20-40% das células (GRANAI et al., 2020).

Além da linhagem linfóide, foi avaliado a ação de EBV LMP1 e RPMS1 em um contexto de carcinoma de nasofaringe, utilizando linhagem NP69^{SV40T}, derivada de células imortalizadas de epitélio de nasofaringe humana. Isto foi realizado para que houvesse mais dados sobre a ação dos genes virais em células humanas, além de que estudos indicam mecanismos semelhantes de ação de LMP1 na regulação de moléculas de *checkpoint* imunológico tanto em linfomas (BI et al., 2016) quanto em carcinoma de nasofaringe (FANG et al., 2014). Os resultados para células expressando gene viral LMP1 mostraram aumento na expressão de transcritos de B7-H3, PD-L1 e PD-L2. Esses dados foram consistente com dados de literatura em relação a interação de LMP1 com PD-L1 (FANG et al., 2014). Porém, para B7-H3 e PD-L2 não há dados publicados sobre interação com produtos do EBV. Para células expressando RPMS1 foi observado aumento na expressão de B7-H3 e PD-L2. Para o transcrito de PD-L1 devido a variação não foi observado diferença estatística.

Importante expressão de moléculas moduladoras de *checkpoints* imunológicos potencialmente regulada pelo vírus tem sido indicada no adenocarcinoma gástrico associado ao EBV. Para avaliar se a expressão de PD-L1 era regulada pela IFN- γ em carcinomas gástricos, linhagens de EBV-positivas (SNU719) e EBV-negativas (SNU1) foram tratadas com IFN- γ , sendo observado um aumento da expressão de mRNA dos genes IDO1 e PD-L1 na linhagem EBV+ SNU719. Nesse estudo, também foi relatado que a indução do ciclo lítico do EBV na linhagem SNU719 ocasionou aumento da expressão de PD-L1, demonstrada por citometria de fluxo. Em trabalho publicado em 2020, foi relatado que o RNA não-codificante (ncRNA) miR-BART5-5p do EBV atuou na regulação de PD-L1 em linhagens de adenocarcinoma gástrico SNU601 e YCCEL1. Nesse trabalho, a transfecção de miR-BART5-5p na linhagem SNU601 (EBV-negativa) ocasionou aumento significativo da expressão de PD-L1, enquanto que o tratamento de células da linhagem EBV+ YCCEL1 com inibidor de miR-BART5-5p diminuiu a expressão de PD-L1 (YOON et al., 2020). Pelo exposto, as evidências de aumento de expressão de PD-L1 em adenocarcinomas gástricos EBV-positivos se somam aos dados de transcriptoma de carcinoma de nasofaringe e que revelaram hiperexpressão de PD-L1 em cânceres EBV-positivos comparados aos cânceres congêneres mas sem infecção pelo EBV (CHAKRAVORTY et al., 2019).

Quanto a transfecção de células linfóides, principalmente derivadas de linfomas, é reconhecida a dificuldade de serem transfectadas por carreadores lipídicos, logo, a transfecção utilizando eletroporação foi a utilizada. Na linhagem Jiyoye, células eletroporadas mostraram

boas taxas de transfecção avaliadas por fluorescência emitida por controle de transfecção Block-iT. Utilizando dsRNA contra o gene endógeno *HPRT*, foi obtido boas taxas de *knock-down* desse gene, nas diferentes concentrações avaliadas. Quanto a repressão de RPMS1 utilizando dsRNAs, os resultados indicaram inconsistência nos níveis de expressão de RPMS1, nos quais a expressão do transcrito de EBV RPMS1 aumentava conforme maior concentração de dsRNA dirigidos contra esse transcrito. Logo, esse método não se apresentou confiável para repressão de genes virais do EBV e foi decidido não prosseguir com o uso de RNAi contra o transcrito de EBV LMP1.

O gene da proteína LAG-3 é geralmente mais expresso em linfócitos T ativos, como CD4+ e CD8+ e com baixa expressão documentada em linfócitos T *naive*. O aumento da expressão desse gene pode decorrer de exposição crônica a antígenos devido a infecção viral, por bactérias ou mesmo pela existência de cânceres (MARUHASHI et al., 2020, p. 3). Há estudos que relatam a hiperexpressão de LAG-3 em amostras clínicas de pacientes com HL (GANDHI et al., 2006; MOERDLER et al., 2020) e em populações de linfócitos B malignos provenientes de pacientes com DLBCL (KEANE et al., 2020). Porém, sua expressão em linhagens celulares é mais restrita. No presente estudo foram testadas linhagens de diferentes origens histogênicas, como BC-1, Jurkat, MDA, NP-69, SAOS-2 e THP-1. Entretanto, nenhuma expressou o gene LAG-3 em nível suficientemente para que pudesse ser utilizada nas etapas de padronização das reações de qPCR. Conforme mostra a Figura S5, reproduzida da plataforma *The Human Protein Atlas* (THUL et al., 2017), o LAG-3 é um alvo expresso significativamente em células HDLM-2 (derivada de HL), mas essa linhagem não foi localizada com nossos colaboradores cessão e uso nesta pesquisa.

Dada sua importância na imunobiologia de carcinogênese, e considerando seu potencial valor tanto prognóstico como terapêutico, moléculas reguladoras de *checkpoints* imunológicos são um tema promissor no que tange aos cânceres associados ao EBV, particularmente linfomas. Porém, ainda é incipiente o conhecimento sobre o papel de produtos do EBV na regulação dessas moléculas. Neste estudo, observou-se interação não previamente descrita dos produtos do EBV, LMP1 e RPMS1, com moléculas associadas com *checkpoints* imunológicos. Por essas razões, este estudo contribui para um melhor entendimento sobre a atuação do vírus na etiopatogenia e progressão de cânceres, além de subsidiar possível desenvolvimento de terapias a base de moduladores de *checkpoints* imunológicos para portadores de cânceres associados ao EBV.

8. Conclusões

Em síntese, a presente dissertação de mestrado mostra que os produtos virais do EBV, LMP1 e RPMS1 possuem papel regulatório de genes relacionados a *checkpoints* imunológico. Células Ramos expressando EBV LMP1 apresentaram aumento na expressão de RNAm de PD-L1 e TIM-3, e diminuição da expressão de BTLA; enquanto que células expressando EBV RPMS1 apresentaram aumento na expressão de RNAm de BTLA e TIM-3 e diminuição na expressão de PD-L1. Este foi o primeiro trabalho a elucidar uma ação imunoregulatoria de EBV RPMS1 propiciando melhor entendimento sobre as propriedades cancerígenas dos produtos virais do EBV. Por fim, o trabalho também descreveu desenhos de iniciadores para análise da expressão em nível transcricional de genes codificadores para moléculas reguladoras de *checkpoints* imunológicos. Os experimentos de eletroporação utilizando sistema Neon indicam obtenção de boas taxas de transfecção e de viabilidade celular nas linhagens testadas, resultados que subsidiam o planejamento de experimentos futuros.

9. Referências

- AL-MOZAINI, M. et al. Epstein-Barr virus BART gene expression. **The Journal of General Virology**, v. 90, n. Pt 2, p. 307–316, fev. 2009.
- ANASTASIADOU, E. et al. Epstein–Barr virus-encoded EBNA2 alters immune checkpoint PD-L1 expression by downregulating miR-34a in B-cell lymphomas. **Leukemia**, p. 1, 26 jun. 2018.
- ANDREWS, L. P. et al. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. **Immunological Reviews**, v. 276, n. 1, p. 80–96, 2017.
- ANSELL, S. M. Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 8, p. 1152–1163, ago. 2015.
- ARVIN, A. et al. (EDS.). **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
- BAIROCH, A. The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. **Journal of Biomolecular Techniques : JBT**, v. 29, n. 2, p. 25–38, jul. 2018.
- BI, X. et al. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF- κ B pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 9, 13 out. 2016.
- BÖGER, C. et al. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 24269–24283, 18 mar. 2016.
- BÖGER, C. et al. The novel negative checkpoint regulator VISTA is expressed in gastric carcinoma and associated with PD-L1/PD-1: A future perspective for a combined gastric cancer therapy? **Oncoimmunology**, v. 6, n. 4, 21 fev. 2017.
- BROCQUEVILLE, G. et al. LMP1-Induced Cell Death May Contribute to the Emergency of Its Oncogenic Property. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e60743, 23 abr. 2013.
- CARROLL, M. C.; ISENMAN, D. E. Regulation of humoral immunity by Complement. **Immunity**, v. 37, n. 2, p. 199–207, 24 ago. 2012.
- CHAKRAVORTY, S. et al. Integrated pan-cancer map of EBV-associated neoplasms reveals functional host-virus interactions. **Cancer research**, v. 79, n. 23, p. 6010–6023, 1 dez. 2019.
- CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S3–S23, fev. 2010.
- CHE, F. et al. Novel B7-H4-mediated crosstalk between human non-Hodgkin lymphoma cells and tumor-associated macrophages leads to immune evasion via secretion of IL-6 and IL-10. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 66, n. 6, p. 717–729, 1 jun. 2017.
- CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. **Nature**, v. 541, n. 7637, p. 321–330, jan. 2017.
- CHENDRIMADA, T. P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 740–744, 4 ago. 2005.

CHRISTOPHE, L. C. et al. Toxicity of the Oncoprotein LMP1 of Epstein Barr Virus as a New Mechanism of LMP1 Regulation Explaining the Heterogeneity of LMP1 Protein Levels in EBV-Transformed B-Cells. **Blood**, v. 108, n. 11, p. 1125, 16 nov. 2006.

CRISTINO, A. S. et al. EBV microRNA-BHRF1-2-5p targets the 3'UTR of immune checkpoint ligands PD-L1 and PD-L2. **Blood**, v. 134, n. 25, p. 2261–2270, 19 2019.

DERKS, S. et al. Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr Virus-infected gastric cancers. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 32925–32932, 28 abr. 2016.

DIRMEIER, U. et al. Latent Membrane Protein 1 Is Critical for Efficient Growth Transformation of Human B Cells by Epstein-Barr Virus. **Cancer Research**, v. 63, n. 11, p. 2982–2989, 1 jun. 2003.

ELGUI DE OLIVEIRA, D.; MÜLLER-COAN, B. G.; PAGANO, J. S. Viral Carcinogenesis Beyond Malignant Transformation: EBV in the Progression of Human Cancers. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 649–664, 2016.

ELIOPOULOS, A. G. et al. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 23, p. 16085–16096, 4 jun. 1999.

ELIOPOULOS, A. G.; YOUNG, L. S. Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). **Oncogene**, v. 16, n. 13, p. 1731–1742, abr. 1998.

ESAU, D. Viral Causes of Lymphoma: The History of Epstein-Barr Virus and Human T-Lymphotropic Virus 1. **Virology : Research and Treatment**, v. 8, 25 set. 2017.

FAN, W. et al. Distinct subsets of primary effusion lymphoma can be identified based on their cellular gene expression profile and viral association. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 1244–1251, jan. 2005.

FANG, W. et al. EBV-driven LMP1 and IFN- γ up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, p. 12189–12202, 15 dez. 2014.

FANG, W. et al. PD-L1 is remarkably over-expressed in EBV-associated pulmonary lymphoepithelioma-like carcinoma and related to poor disease-free survival. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 33019–33032, 20 out. 2015.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 1 mar. 2015.

FYRBERG, A.; LOTFI, K. Optimization and evaluation of electroporation delivery of siRNA in the human leukemic CEM cell line. **Cytotechnology**, v. 62, n. 6, p. 497–507, 1 dez. 2010.

GALANINA, N.; KLINE, J.; BISHOP, M. R. Emerging role of checkpoint blockade therapy in lymphoma. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 8, n. 2, p. 81–90, fev. 2017.

GANDHI, M. K. et al. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8⁺ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 2280–2289, 1 out. 2006.

GIRES, O. et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 11, p. 3064–3073, 1 jun. 1999.

GRANAI, M. et al. Immune landscape in Burkitt lymphoma reveals M2-macrophage polarization and correlation between PD-L1 expression and non-canonical EBV latency program. **Infectious Agents and Cancer**, v. 15, n. 1, p. 28, 6 maio 2020.

GRAVELLE, P. et al. Impaired functional responses in follicular lymphoma CD8+TIM-3+ T lymphocytes following TCR engagement. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 10, 24 ago. 2016.

GRAVELLE, P. et al. Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies. **Oncotarget**, v. 8, n. 27, p. 44960–44975, 29 mar. 2017.

GREEN, M. R. et al. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 6, p. 1611–1618, 15 mar. 2012.

GUASPARRI, I.; BUBMAN, D.; CESARMAN, E. EBV LMP2A affects LMP1-mediated NF-kappaB signaling and survival of lymphoma cells by regulating TRAF2 expression. **Blood**, v. 111, n. 7, p. 3813–3820, 1 abr. 2008.

HABESHAW, G. et al. Epstein-barr virus nuclear antigen 1 sequences in endemic and sporadic Burkitt's lymphoma reflect virus strains prevalent in different geographic areas. **Journal of Virology**, v. 73, n. 2, p. 965–975, fev. 1999.

HENDERSON, S. et al. Induction of bcl-2 expression by epstein-barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. **Cell**, v. 65, n. 7, p. 1107–1115, 28 jun. 1991.

HUEN, D. S. et al. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. **Oncogene**, v. 10, n. 3, p. 549–560, 2 fev. 1995.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. **A Review of Human Carcinogens - Part B: Biological Agents**. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2011. v. 100

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 100, n. Pt B, p. 1–441, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

JACOB, F. et al. Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e59180, 2013.

JIANG, Y. et al. B7-H4 is highly expressed in aggressive Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma and inhibits apoptosis through upregulating Erk1/2 and Akt signalling pathways. **Infectious Agents and Cancer**, v. 14, 8 ago. 2019.

KARRAN, L. et al. Expression of a family of complementary-strand transcripts in Epstein-Barr virus-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, n. 17, p. 8058–8062, 1 set. 1992.

KEANE, C. et al. The tumour microenvironment is immuno-tolerogenic and a principal determinant of patient outcome in EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma. **European Journal of Haematology**, v. 103, n. 3, p. 200–207, set. 2019.

KEANE, C. et al. LAG3: a novel immune checkpoint expressed by multiple lymphocyte subsets in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood Advances**, v. 4, n. 7, p. 1367–1377, 14 abr. 2020.

KIYASU, J. et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v. 126, n. 19, p. 2193–2201, 5 nov. 2015.

KLEIN, G.; DOMBOS, L.; GOTHOSKAR, B. Sensitivity of Epstein-Barr virus (EBV) producer and non-producer human lymphoblastoid cell lines to superinfection with EB-virus. **International Journal of Cancer**, v. 10, n. 1, p. 44–57, 15 jul. 1972.

LAHERTY, C. D. et al. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 34, p. 24157–24160, 12 maio 1992.

LI, A. et al. Transcriptional Expression of RPMS1 in Nasopharyngeal Carcinoma and Its Oncogenic Potential. **Cell Cycle**, v. 4, n. 2, p. 303–308, 19 fev. 2005.

MA, S.-D. et al. PD-1/CTLA-4 Blockade Inhibits Epstein-Barr Virus-Induced Lymphoma Growth in a Cord Blood Humanized-Mouse Model. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 5, p. e1005642, 2016.

MARTEL, C. DE et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. e180–e190, 1 fev. 2020.

MARUHASHI, T. et al. LAG-3: from molecular functions to clinical applications. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 8, n. 2, p. e001014, 1 set. 2020.

MATSUURA, H. et al. Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 52, p. 22641–22646, 28 dez. 2010.

MCCORMICK, K. J. et al. Complement-fixation test for detection of herpes-like viruses in cell cultures of Burkitt's lymphoma. **Journal of Virology**, v. 3, n. 5, p. 525–527, maio 1969.

MOERDLER, S. et al. LAG-3 overexpression in pediatric Hodgkin lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 15_suppl, p. 10531–10531, 20 maio 2020.

MÜLLER-COAN, BÁRBARA GRASIELE. **Efeitos da Oncoproteína LMP1 do Vírus de Epstein-Barr no Potencial de Invasão e na Expressão de microRNAs Endógenos em Células Humanas in vitro.**

Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)—Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2016.

MURATA, T.; TSURUMI, T. Switching of EBV cycles between latent and lytic states: Regulation of EBV reactivation. **Reviews in Medical Virology**, v. 24, n. 3, p. 142–153, maio 2014.

MURPHY, K. M.; NELSON, C. A.; ŠEDÝ, J. R. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 9, p. 671–681, set. 2006.

NIRSCHL, C. J.; DRAKE, C. G. Molecular Pathways: Coexpression of Immune Checkpoint Molecules: Signaling Pathways and Implications for Cancer Immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 18, p. 4917–4924, 15 set. 2013.

PENNOCK, N. D. et al. T cell responses: naïve to memory and everything in between. **Advances in Physiology Education**, v. 37, n. 4, p. 273–283, dez. 2013.

PODOJIL, J. R.; MILLER, S. D. Potential targeting of B7-H4 for the treatment of cancer. **Immunological Reviews**, v. 276, n. 1, p. 40–51, 2017.

RANGANATHAN, P.; WEAVER, K. L.; CAPOBIANCO, A. J. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. **Nature Reviews. Cancer**, v. 11, n. 5, p. 338–351, maio 2011.

RAO, X. et al. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. **Biostatistics, bioinformatics and biomathematics**, v. 3, n. 3, p. 71–85, ago. 2013.

ROEMER, M. G. M. et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 23, p. 2690–2697, 10 ago. 2016.

ROSE, S. D. et al. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 13, p. 4140–4156, 2005.

ROSSILLE, D. et al. Soluble Programmed Death-Ligand 1 as a prognostic biomarker for overall survival in patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma: a replication study and combined analysis of 508 patients. **Leukemia**, v. 31, n. 4, p. 988–991, abr. 2017.

SHANBHAG, S.; AMBINDER, R. F. Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 2, p. 116–132, [s.d.].

SHARPE, A. H.; PAUKEN, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 3, p. 153–167, mar. 2018.

SHI, M. et al. Expression of Programmed Cell Death 1 Ligand 2 (PD-L2) is a Distinguishing Feature of Primary Mediastinal (Thymic) Large B-cell Lymphoma and Associated with PDCD1LG2 Copy Gain. **The American journal of surgical pathology**, v. 38, n. 12, p. 1715–1723, dez. 2014.

SMITH, P. R. et al. Structure and Coding Content of CST (BART) Family RNAs of Epstein-Barr Virus. **Journal of Virology**, v. 74, n. 7, p. 3082–3092, abr. 2000.

SUN, C.; MEZZADRA, R.; SCHUMACHER, T. N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. **Immunity**, v. 48, n. 3, p. 434–452, 20 mar. 2018.

TAKADA, K. et al. An Epstein-Barr virus-producer line Akata: Establishment of the cell line and analysis of viral DNA. **Virus Genes**, v. 5, n. 2, p. 147–156, 1 jun. 1991.

THUL, P. J. et al. A subcellular map of the human proteome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 356, n. 6340, 26 maio 2017.

UCHIDA, J. et al. Mimicry of CD40 Signals by Epstein-Barr Virus LMP1 in B Lymphocyte Responses. **Science**, v. 286, n. 5438, p. 300–303, 8 out. 1999.

WALKER, L. S. K.; SANSOM, D. M. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, n. 12, p. 852–863, 25 2011.

WU, S. et al. Conservation and polymorphism of EBV RPMS1 gene in EBV-associated tumors and healthy individuals from endemic and non-endemic nasopharyngeal carcinoma areas in China. **Virus Research**, v. 250, p. 75–80, 2 maio 2018.

YAMAMOTO, T.; IWATSUKI, K. Diversity of Epstein-Barr virus BamHI-A rightward transcripts and their expression patterns in lytic and latent infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. Pt 10, p. 1445–1453, out. 2012.

YANG, Z.-Z. et al. Expression of LAG-3 defines exhaustion of intratumoral PD-1+ T cells and correlates with poor outcome in follicular lymphoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 37, p. 61425–61439, 29 maio 2017.

YOON, C. J. et al. Epstein–Barr virus-encoded miR-BART5-5p upregulates PD-L1 through PIAS3/pSTAT3 modulation, worsening clinical outcomes of PD-L1-positive gastric carcinomas. **Gastric Cancer**, v. 23, n. 5, p. 780–795, 1 set. 2020.

YOUNG, L. S.; RICKINSON, A. B. Epstein–Barr virus: 40 years on. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 10, p. 757–768, out. 2004.

YOUNG, L. S.; YAP, L. F.; MURRAY, P. G. Epstein–Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 12, p. 789–802, dez. 2016.

ZHANG, L. et al. The costimulatory molecule B7-H4 promote tumor progression and cell proliferation through translocating into nucleus. **Oncogene**, v. 32, n. 46, p. 5347–5358, 14 nov. 2013.

10. Material Suplementar

Quadro S1 - Listagem de iniciadores empregados para análise de expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas na regulação de checkpoints imunológicos

Proteína (Gene)	Transcrito(s) ¹	Sequência (5' -3')	Amplicon (bp)	Ref. ²
B7-H3 (CD276)	NM_001024736.2 NM_025240.2 NM_001329628.1 NM_001329629.1	S: GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA AS: GGTCCTCATGGTCAGGCTATT	164	Desenho original
B7-H4 (VTCN1)	NM_024626.4 NM_001253849.1 NM_001253850.1	S: CTTCTGCCTCTCAGCCCTTA AS: GAAATAGTTCTGTAGATCCCTGTTG	100	Che et al. 2017 (CHE et al., 2017, p. 7)
BTLA (CD272)	NM_181780.4 NM_001085357.1	S: TCTGGACATCTGGAACATC AS: AAAGGGATCTCCTGCTAAG	97	Desenho original
CTLA-4 (CD152)	NM_005214.5 NM_001037631.3	S: TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC AS: TCACACACAAAGCTGGCGAT	93	Desenho original
LAG-3 (CD223)	NM_002286.6	S: GCGGGGACTTCTCGCTATG AS: TCAAATGACCCAGTCGGAGG	177	Desenho original
PD-L1 (CD274)	NM_014143.4 NM_001267706.1 NM_001314029.1	S: GCCCCATACAACAAAATCAACC AS: GCTTGTCCAGATGACTTCGG	114	Desenho original
PD-L2 (PDCD1LG2)	NM_025239.3	S: ACCCAGGACCCATCCAATT AS: ACCACAGGTTCCAGATAGCACT	190	Desenho original
TIM-3 (HAVCR2)	NM_032782.5	S: CTTTCCAAGGATGCTTACCAC AS: CAGATCCCTGCTCCGATGTA	189	Desenho original
VISTA (VSIR)	NM_022153.2	S: TCATCCTGCTCCTGGTCTACA AS: TCCCTTGAATGTTGCTGTCCA	90	Desenho original

¹ Código na base de dados Genbank (NCBI) para sequências de referência de transcritos para os genes-alvo indicados; ² Iniciadores indicados como “Desenho original” foram desenhados pelos pesquisadores do presente trabalho. S: Iniciador sense; AS: iniciador antisense

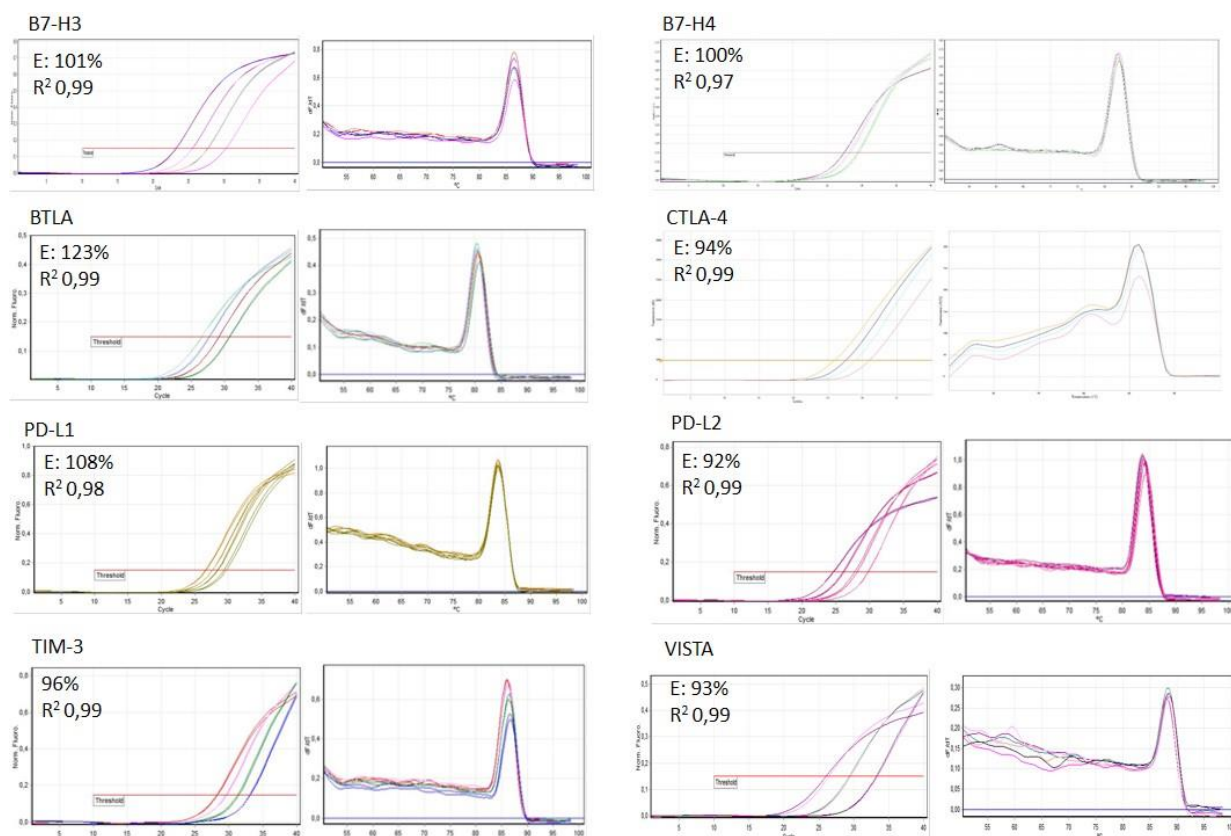


Figura S1 - Curvas de amplificação com os valores de R^2 alcançados e curvas de dissociação dos iniciadores selecionados para análise de expressão de genes codificadores de proteínas de checkpoint imunológico. As linhagens celulares utilizadas para os alvos são MCF-7 para B7-H3 e B7-H4; Rael para BTLA; BC-1 para CTLA-4; NP69 para PD-L1; e THP-1 para PD-L2, TIM-3 e VISTA. Foi realizado diluições seriadas 1:3 para os alvos BTLA, CTLA-4, PD-L2 e TIM-3; 1:5 para o alvo B7-H3; 1:2 para os alvos B7-H4 e PD-L1; e 1:10 para o alvo VISTA.

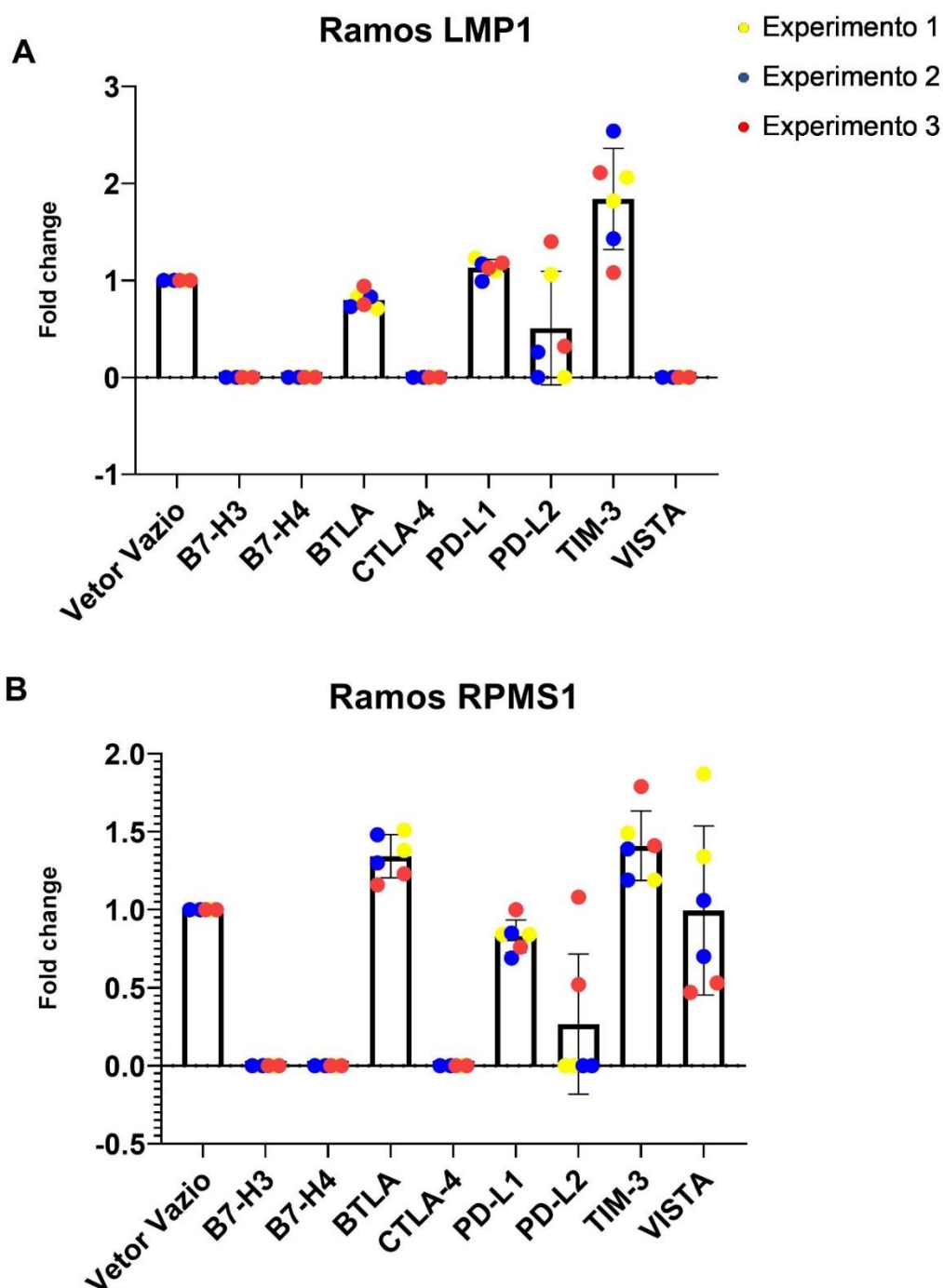


Figura S2 – Níveis de expressão em nível transcricional de moléculas de *checkpoint* imunológico em células Ramos avaliadas por qPCR, 48h após transfecção com vetor codificante de EBV LMP1 (A) e RPMS1 (B). Expressão gênica normalizada pela expressão de *RPS18* e *HSP90* para experimentos com EBV LMP1; e *RPS13* e *HPRT* para experimentos com EBV RPMS1. Os resultados para células expressando LMP1 (A) apontam diminuição na expressão de transcrito de BTLA; aumento de expressão de transcrito de PD-L1 e TIM-3. Os resultados para células expressando RPMS1 (B) apontam aumento na expressão de transcrito de BTLA e TIM-3; e diminuição de transcrito de PD-L1. A expressão dos transcritos de B7-H3, B7-H4 e CTLA-4 se mantiveram não

detectáveis em ambos tratamentos. A expressão diferencial dos transcritos de PD-L2 e VISTA não podem ser avaliados devido níveis de expressão inconsistentes.

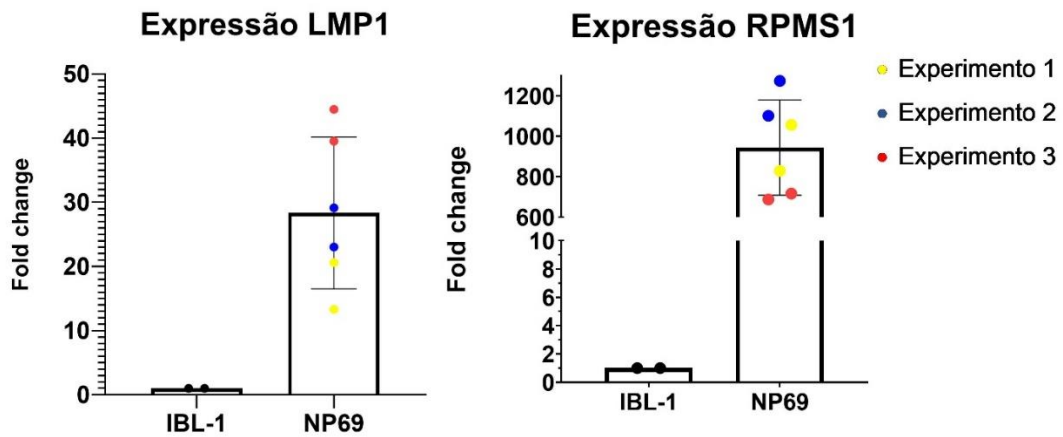


Figura S3 - Células NP69 após 48h de transfecção com 1 μ g de vetor pZsGLMP1_B95-8 e pcDNARPMS1. Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de *RPS18* e *HSP90*. Linhagem IBL-1 utilizada como referência e controle de expressão de LMP1 e RPMS1.

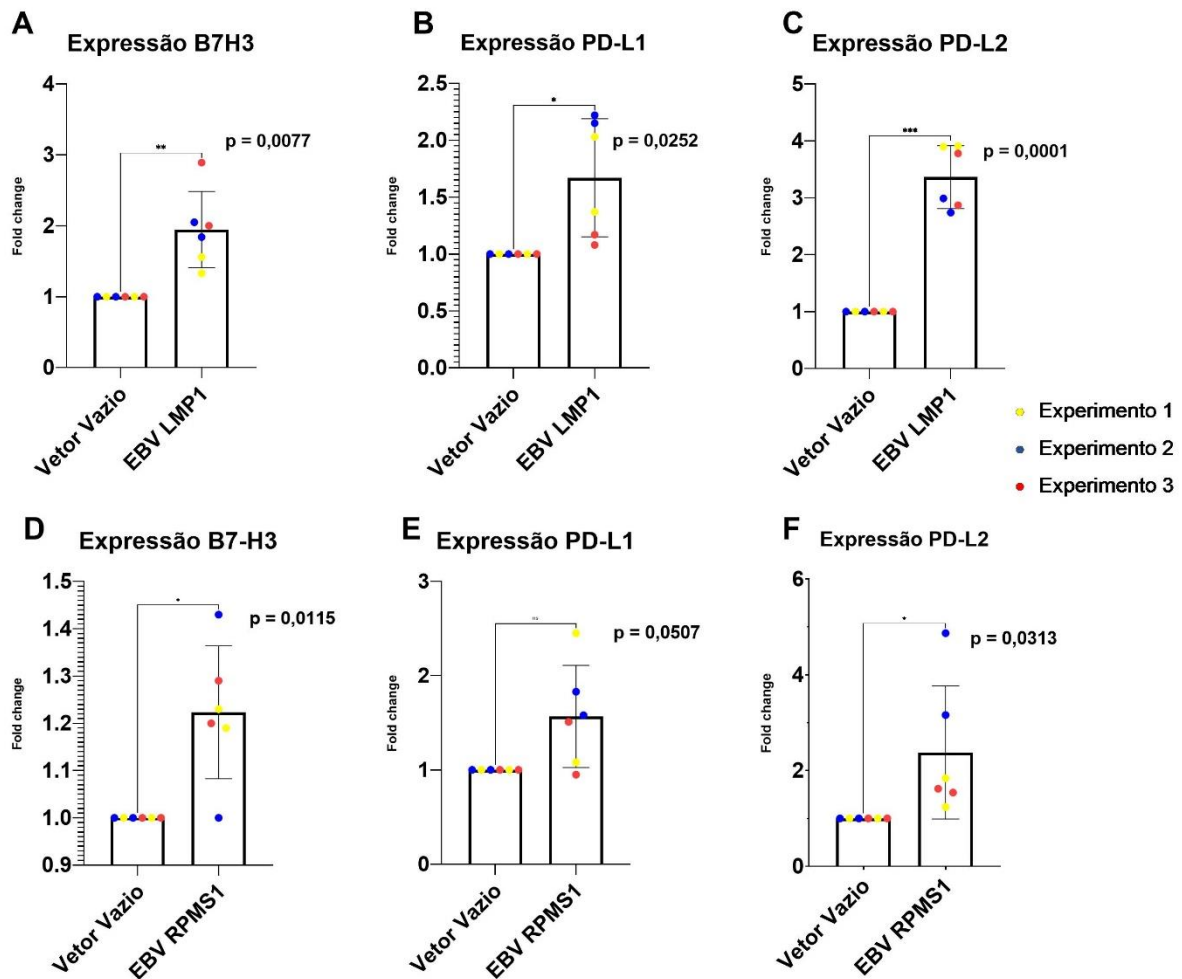


Figura S4 - Expressão diferencial dos transcritos de B7-H3, PD-L1 e PD-L2, em linhagem NP69, 48h após transfecção com vetor codificante de EBV LMP1 (A-C) e EBV RPMS1 (D-F). Expressão gênica normalizada pela expressão de *RPS18* e *HSP90* para experimentos com EBV LMP1; e *RPS13* e *HPRT* para experimentos com EBV RPMS1. Os resultados para células expressando LMP1 apontam aumento na expressão de transcrito de B7-H3 (A), PD-L1 (B) e PD-L2 (C). Os resultados para células expressando RPMS1 apontam aumento na expressão de transcrito de B7-H3 (D) e PD-L2 (F), e diferença não significativa para PD-L1 (E). Os genes de B7-H4, BTLA, CTLA-4, TIM-3 e VISTA se mantiveram sem expressão detectável com os tratamentos.

Tabela S1 - Valores dos Cts gerados a partir da amplificação por qRT-PCR dos genes codificadores de *checkpoint* imunológico analisados, nas condições experimentais avaliadas (células transfectadas com vetores vazios e codificantes de EBV LMP1 e RPMS1), para os as linhagens testadas (Ramos e NP69).

Linhagem Ramos		Vetor-base 1 (Ct)					Vetor EBV LMP1 (Ct)					Vetor-base 2 (Ct)					Vetor EBV RPMS1 (Ct)				
Exp.	Replicata	BTLA	PDL1	PDL2	TIM3	VISTA	BTLA	PDL1	PDL2	TIM3	VISTA	BTLA	PDL1	PDL2	TIM3	VISTA	BTLA	PDL1	PDL2	TIM3	VISTA
A	A1	29,33	31,14		35,63		30,52	31,53	35,53	35,05		29,69	31,4		35,16	35,39	28,28	30,7	34,16	33,77	33,54
	A2	29,33	31,14		36,46		30,45	31,84	0	35,5		29,69	31,4		35,49	35,39	28,1	30,66	33,28	34,08	33,97
B	B1	29,08	30,89		35,7		29,04	30,49	34,39	34,21		28,49	31,18		34,32	34,14	28,39	31,13	34,67	34,15	34,18
	B2	29,08	30,89	35,83	34,97		29,24	31,31	37,61	34,26		28,49	31,18		35,53	34,14	28,15	31,37	33,92	34,27	34,62
C	C1	27,88	30,72	35,34	34,97		28,64	30,8	33,3	33,31		29,17	31,51	35,63	37,28	34,72	27,78	30,92	34,7	34,55	35
	C2	27,88	30,72	34,57	36,05		28,55	30,94	34,63	33,41		29,17	31,51	35,63	37,28	34,72	27,8	31,06	35,57	35,43	34,64
	Ct Médio:	28,76	30,91	17,62	35,63		29,40	31,15	29,24	34,29		29,11	31,36		35,84	34,75	28,08	30,97	34,38	34,37	34,325
	Desv. Pad.	0,693	0,188	19,30	0,590		0,873	0,499	14,39	0,869		0,538	0,150		1,194	0,559	0,248	0,270	0,783	0,575	0,530
	CV%	2%	1%	110%	2%		3%	2%	49%	3%		2%	0%		3%	2%	1%	1%	2%	2%	2%

Linhagem NP69		Vetor-base 1 (Ct)			Vetor EBV LMP1 (Ct)			Vetor-base 2 (Ct)			Vetor EBV RPMS1 (Ct)		
Exp.	Replicata	B7-H3	PD-L1	PD-L2	B7-H3	PD-L1	PD-L2	B7-H3	PD-L1	PD-L2	B7-H3	PD-L1	PD-L2
A	A1	25,93	30,85	31,04	26,91	29,97	30,47	24,95	29,98	31,86	24,98	29,02	31,31
	A2	26,12	30,17	31,04	26,96	29,86	30,55	25,04	28,98	31,75	25,11	29,19	31,76
B	B1	25,12	28,87	32,35	22,67	29,16	29,48	25,44	30,53	34,61	25,31	30,04	32,71
	B2	25,12	28,87	32,35	22,73	29,2	29,26	25,12	30,53	34,61	25,49	30,24	33,32
C	C1	25,94	29,75	33,37	22,16	28,1	29,6	24,13	28,75	31,46	23,62	28,57	30,51
	C2	25,94	29,75	34,27	22,69	28,13	30,1	24,13	28,75	31,46	24,02	28,41	31,09
	Ct Médio:	25,69	29,71	32,40	24,02	29,07	29,91	24,80	29,58	32,62	24,75	29,24	31,78
	Desv. Pad.	0,451	0,764	1,276	2,267	0,810	0,540	0,545	0,860	1,545	0,755	0,752	1,053
	CV%	2%	3%	4%	9%	3%	2%	2%	3%	5%	3%	3%	3%

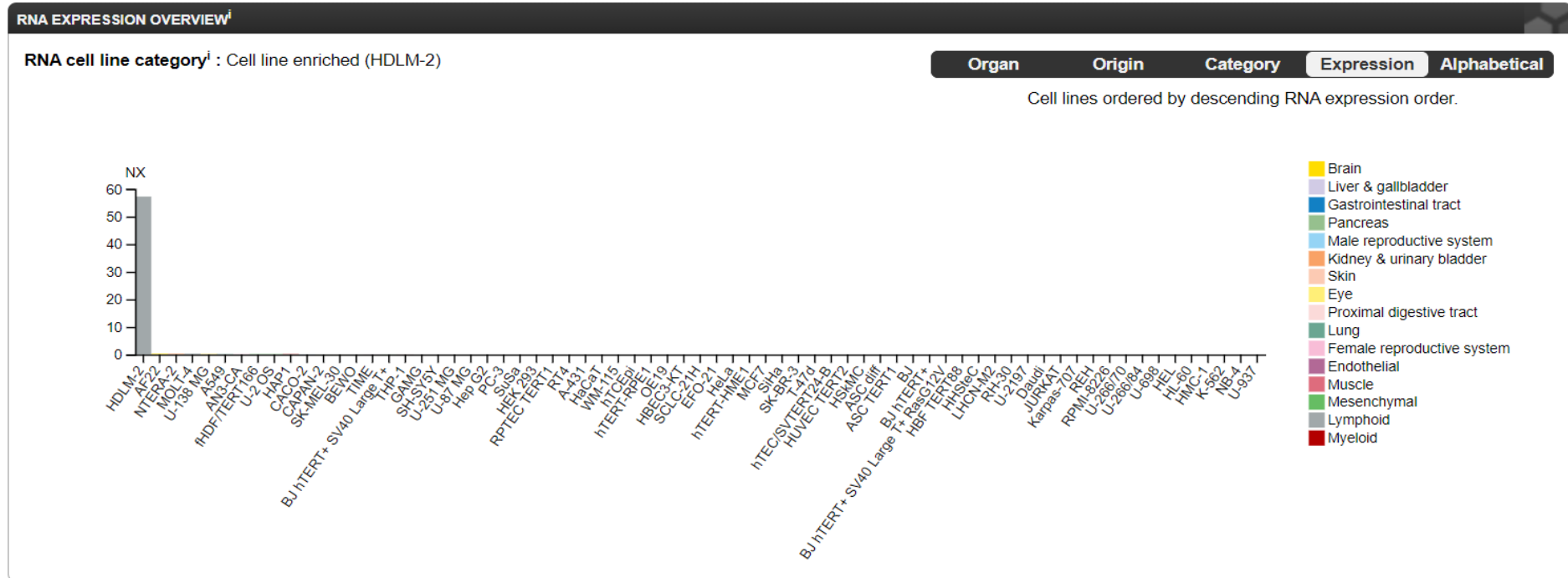


Figura S5 - Human Protein Atlas. LAG-3. Dado disponível de v20.0.proteinatlas.org. Acesso em 26/11/2020

11. Apêndices

11.1 Apêndice I

Em relação a última etapa do trabalho que seria no caso de ser identificada uma ou mais moléculas de *checkpoint* imunológico reguladas pela expressão de EBV LMP1 ou RPMS1, verificaria eventuais mudanças no fenótipo das células cultivadas *in vitro* submetidas a restrição da expressão dessas moléculas empregando tecnologia de RNAi. Porém, em virtude da pandemia do COVID-19 e o isolamento social, houve paralisação dos experimentos no laboratório sede da pesquisa (IBTEC), sendo retomada as atividades de forma gradual apenas no segundo semestre de 2020, fazendo com o que o andamento da pesquisa ocorresse de forma mais vagarosa.

Além disso, durante a padronização dos experimentos de repressão gênica dos produtos virais do EBV utilizando RNAi, foi notado que este método não se apresentou confiável para utilização em linhagens linfoides, então foi optado por não seguir com este método para os próximos experimentos.

Por estas razões e devido ao tempo remanescente a pesquisa, esta última etapa do projeto não pode ser realizada.

11.2 Apêndice II

Anotações para confirmação das regiões de anelamento dos iniciadores *sense* e *antisense*, potencial de formação de dímeros e outras estruturas indesejáveis, bem como os tamanhos de amplicons esperados após amplificação por qPCR. As sequências dos transcritos para os genes selecionados foram extraídas da base de dados Genbank, do Centro de Informações Biotecnológicas dos EUA (*National Centers for Biotechnology Information – NCBI*; Bethesda, MD, EUA). Subsequentemente foi realizada a seleção das sequências dos iniciadores com auxílio da ferramenta online *Primer Blast* (NCBI) e os softwares *OligoExplorer* v.1.1 e *OligoAnalyzer* v.1.2 (ambos GeneLink Inc., Orlando, FL, EUA).

B7-H3 (CD276)

F: 5' GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA 3'

R: 5' GGCCTCATGGTCAGGCTATT 3' / C: 3' AATAGCCTGACCATGAGGACC 5'

Exon-7 Exon-8 Exon-9 Exon-10

>NM_001024736.2 Homo sapiens CD276 molecule (CD276), transcript variant 1, mRNA

gtctgtctgtctcattgcactgctggtggccctgGCTTTCGTGTGCTGGAGAAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGACCATGAGGACCagggagctgctaccctccctacagctcctaccctctggctgcaatggggctgactgtgagccctgcccccaacagat

>NM_025240.2 Homo sapiens CD276 molecule (CD276), transcript variant 2, mRNA

ggcagcctatgacattccccccagaggccctgtgggtgaccgtggggctgtctgtctgtctcattgcactgctggtggccctgGCTTTCGTGTGCTGGAGAAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGACCATGAGGACCagggagctgctaccctccctacagct

>NM_001329628.1 Homo sapiens CD276 molecule (CD276), transcript variant 3, mRNA

tgacattccccccagaggccctgtgggtgaccgtggggctgtctgtctgtctcattgcactgctggtggccctgGCTTTCGTGTGCTGGAGAAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGACCATGAGGACCagggagctgctaccctccctacagctcctaccctct

>NM_001329629.1 Homo sapiens CD276 molecule (CD276), transcript variant 4, mRNA

cctgGCTTTCGTGTGCTGGAGAAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGACCATGAGGACCagggagctgctaccct

Proteínas LMP1 e RPMS1 do EBV na regulação de checkpoints imunitários

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA	20	59.06	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	GGTCCTCATGGTCAGGCTATT	21	59.23	52.38	4.00	1.00

Products on target templates

>NM_025240.3 Homo sapiens CD276 molecule (CD276), transcript variant 2, mRNA

```
product length = 164
Forward primer 1 GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA 20
Template       931 ..... 950
Reverse primer 1 GGTCCTCATGGTCAGGCTATT 21
Template       1094 ..... 1074
```

>NM_001329629.2 Homo sapiens CD276 molecule (CD276), transcript variant 4, mRNA

```
product length = 164
Forward primer 1 GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA 20
Template       1452 ..... 1471
Reverse primer 1 GGTCCTCATGGTCAGGCTATT 21
Template       1615 ..... 1595
```

>NM_001329628.2 Homo sapiens CD276 molecule (CD276), transcript variant 3, mRNA

```
product length = 164
Forward primer 1 GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA 20
Template       983 ..... 1002
Reverse primer 1 GGTCCTCATGGTCAGGCTATT 21
Template       1146 ..... 1126
```

>NM_001024736.2 Homo sapiens CD276 molecule (CD276), transcript variant 1, mRNA

```
product length = 164
Forward primer 1 GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA 20
Template       1585 ..... 1604
Reverse primer 1 GGTCCTCATGGTCAGGCTATT 21
Template       1748 ..... 1728
```

<u>B7H3.F</u>	<u>B7H3.R</u>
Name : B7H3.F	Name : B7H3.R
Primer : 5'- GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA-3'	Primer : 5'- GGTCCTCATGGTCAGGCTATT-3'
Reverse : 3'- AAAGAGGTCGTGTGCTTTTCG-5'	Reverse : 3'- TTATCGGACTGGTACTCCTGG-5'
Length : 20 nt	Length : 21 nt
Tm (basic) : 60,0 °C	Tm (basic) : 64,0 °C
Tm (salt) : 58,4 °C	Tm (salt) : 61,3 °C
Tm (NN) : 59,0 °C	Tm (NN) : 63,0 °C
GC % : 50,0 %	GC % : 52,4 %
dG : -39,7 kCal/mol	dG : -43,9 kCal/mol
3'-tail GC % : 42,9 %	3'-tail GC % : 42,9 %
3'-tail dG : -9,7 kCal/mol	3'-tail dG : -9,4 kCal/mol
Molecular weight : 6250,0 g/mol	Molecular weight : 6490,2 g/mol
1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,62 µM and contains 28,9 µg ssDNA	1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,72 µM and contains 30,7 µg ssDNA
<u>B7H3.F self annealing:</u>	<u>B7H3.R self annealing:</u>
5'-GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA-3' :: ::: 3'-AAAGAGGTCGTGTGCTTTTCG-5' dG: -1,74 kcal/mol	5'-GGTCCTCATGGTCAGGCTATT- 3' : : 3'-TTATCGGACTGGTACTCCTGG-5' dG: -2,29 kcal/mol
<u>B7H3.F loops:</u>	5'-GGTCCTCATGGTCAGGCTATT-3' : :::

<p>5'-GCTTTCGTGTG) 3'-AAAGAGGTC dG: -1,32 kcal/mol</p>	<p>3'-TTATCGGACTGGTACTCCTGG-5' dG: -2,01 kcal/mol</p> <p><u>B7H3.R loops:</u></p> <p>5'-GGTCCTCAT : G 3'-TTATCGGACTG dG: -1,59 kcal/mol</p>
<p><u>B7H3.F - B7H3.R annealing:</u></p> <p>5'-GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA-3' : 3'-TTATCGGACTGGTACTCCTGG-5' dG: -2,85 kcal/mol</p> <p>5'-GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA-3' : : : : : : 3'-TTATCGGACTGGTACTCCTGG-5' dG: -1,38 kcal/mol</p> <p>5'-GCTTTCGTGTGCTGGAGAAA-3' : : 3'-TTATCGGACTGGTACTCCTGG-5' dG: -0,88 kcal/mol</p>	

B7-H4 (VTCN1) – PMID: [25400757](#)

F: 5' CACCAGGATAACATCTCTCAGTGAA 3'

R: 5' TGGCTTGACAGGGTAGAATGA 3' / C: 3' TCATTCTACCCTGCAAGCCA 5'

Exon-6

>NM_024626.4 Homo sapiens V-set domain containing T cell activation inhibitor 1 (VTCN1), transcript variant 1, mRNA

caaataagcattctgtctcttggctgctgcctcagcacagagagccagaactctatcggg**CACCAGGATAACATCTCTCAGTG**
AACAGAGTTGACAAGGCCTATGGGAAATGCCTGATGGGATTATCTTCAGCTTGTTGAGCTTCTAA
GTTTCTTTCCCTTCATTCTACCCTGCAAGCCAagttctgtaagagaaatgcctgagttctagctcaggttttctactctgaatt
 tagatctccagaccctgcctggccacaattcaaattaaggcaa

>NM_001253849.1 Homo sapiens V-set domain containing T cell activation inhibitor 1 (VTCN1), transcript variant 2, mRNA

caaataagcattctgtctcttggctgctgcctcagcacagagagccagaactctatcggg**CACCAGGATAACATCTCTCAGTG**
AACAGAGTTGACAAGGCCTATGGGAAATGCCTGATGGGATTATCTTCAGCTTGTTGAGCTTCTAA
GTTTCTTTCCCTTCATTCTACCCTGCAAGCCAagttctgtaagagaaatgcctgagttctagctcaggttttctactctgaatt
 tagatctccagaccctgcctggccacaattcaaattaaggcaa

>NM_001253850.1 Homo sapiens V-set domain containing T cell activation inhibitor 1 (VTCN1), transcript variant 3, mRNA

caaataagcattctgtctcttggctgctgcctcagcacagagagccagaactctatcggg**CACCAGGATAACATCTCTCAGTG**
AACAGAGTTGACAAGGCCTATGGGAAATGCCTGATGGGATTATCTTCAGCTTGTTGAGCTTCTAA
GTTTCTTTCCCTTCATTCTACCCTGCAAGCCAagttctgtaagagaaatgcctgagttctagctcaggttttctactctgaatt
 tagatctccagaccctgcctggccacaattcaaattaaggcaa

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTTCTGCCTCTCAGCCCTTA	20	58.80	55.00	3.00	2.00
Reverse primer	GAAATAGTTCTGTAGATCCCTGTTG	25	57.22	40.00	6.00	0.00

Products on target templates

>NM_001253850.2 Homo sapiens V-set domain containing T cell activation inhibitor 1 (VTCN1), transcript variant 3, mRNA

```
product length = 100
Forward primer 1 CTTCTGCCTCTCAGCCCTTA 20
Template 538 ..... 557
Reverse primer 1 GAAATAGTTCTGTAGATCCCTGTTG 25
Template 637 ..... 613
```

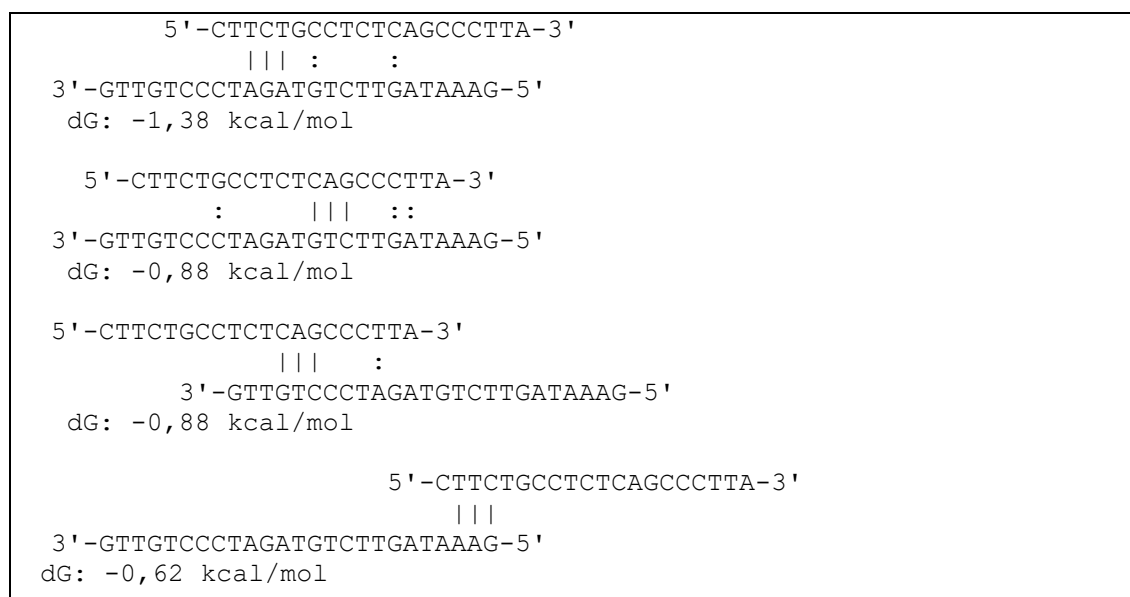
>NM_001253849.2 Homo sapiens V-set domain containing T cell activation inhibitor 1 (VTCN1), transcript variant 2, mRNA

```
product length = 100
Forward primer 1 CTTCTGCCTCTCAGCCCTTA 20
Template 1001 ..... 1020
Reverse primer 1 GAAATAGTTCTGTAGATCCCTGTTG 25
Template 1100 ..... 1076
```

>NM_024626.4 Homo sapiens V-set domain containing T cell activation inhibitor 1 (VTCN1), transcript variant 1, mRNA

```
product length = 100
Forward primer 1 CTTCTGCCTCTCAGCCCTTA 20
Template 886 ..... 905
Reverse primer 1 GAAATAGTTCTGTAGATCCCTGTTG 25
Template 985 ..... 961
```

<u>B7-H4.F</u>	<u>B7-H4.R</u>
Name : B7-H4.F	Name : B7-H4.R
Primer : 5'-CTTCTGCCTCTCAGCCCTTA-3'	Primer : 5'-GAAATAGTTCTGTAGATCCCTGTTG-3'
Reverse : 3'-ATTCCCGACTCTCCGTCTTC-5'	Reverse : 3'-GTTGTCCCTAGATGTCTTGATAAAAG-5'
Length : 20 nt	Length : 25 nt
Tm (basic) : 62,0 °C	Tm (basic) : 70,0 °C
Tm (salt) : 60,5 °C	Tm (salt) : 62,5 °C
Tm (NN) : 62,7 °C	Tm (NN) : 58,9 °C
GC % : 55,0 %	GC % : 40,0 %
dG : -41,9 kCal/mol	dG : -45,1 kCal/mol
3'-tail GC % : 57,1 %	3'-tail GC % : 57,1 %
3'-tail dG : -11,6 kCal/mol	3'-tail dG : -9,9 kCal/mol
Molecular weight : 6016,9 g/mol	Molecular weight : 7749,0 g/mol
1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 5,66 µM and contains 34,1 µg ssDNA	1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 3,74 µM and contains 29,0 µg ssDNA
<u>B7-H4.F self annealing:</u>	<u>B7-H4.R self annealing:</u>
5'-CTTCTGCCTCTCAGCCCTTA-3' :::	5'-GAAATAGTTCTGTAGATCCCTGTTG-3'
3'-ATTCCCGACTCTCCGTCTTC-5' dG: -0,88 kcal/mol	3'-GTTGTCCCTAGATGTCTTGATAAAAG-5' dG: -3,30 kcal/mol
<u>B7-H4.F loops:</u>	<u>B7-H4.R loops:</u>
5'-CTTCTGCC T	5'-GAAATAGTTCTGTAGATCCCTGTTG-3' : : : :: : : :
3'-ATTCCCGACTC dG: -0,46 kcal/mol	3'-GTTGTCCCTAGATGTCTTGATAAAAG-5' dG: -1,38 kcal/mol
	5'-GAAATAGTTCTGTAGATCCCTGTTG-3' :: :::
	3'-GTTGTCCCTAGATGTCTTGATAAAAG-5' dG: -0,62 kcal/mol
	<u>B7-H4.R loops:</u>
	5'-GAAAT)
	3'-GTTGTCCCTAGATGTCTTGA dG: -0,20 kcal/mol
<u>B7-H4.F - B7-H4.R annealing:</u>	
5'-CTTCTGCCTCTCAGCCCTTA-3' : :::	
3'-GTTGTCCCTAGATGTCTTGATAAAAG-5' dG: -1,38 kcal/mol	



BTLA (CD272)

F: 5' TCTGGACATCTGGAACATC 3'

R: 5' AAAGGGATCTCCTGCTAAG 3' / C: 3' CTTAGCAGGAGATCCCTTT 5'

Exon-1 Exon-2

>NM_181780.4 Homo sapiens B and T lymphocyte associated (BTLA), transcript variant 1, mRNA

agttatttcacagatgccactggggtaggtaaactgaccaactctgcagcactcagaagacgaagcaaagccttctacttgagcag
 tttttccatcactgatatgtgcaggaaatgaagacattgcctgccatgcttggactgggaaatttttgggtcttcttctaatcccat
 a**TCTGGACATCTGGAACATC**CATGGGAAAGAATCATGTGATGTACAGCTTTATATAAAGAGACAATC
 TGAACACTCCAT**CTTAGCAGGAGATCCCTTT**gaactagaatgccctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgact
 tggtgca

>NM_001085357.2 Homo sapiens B and T lymphocyte associated (BTLA), transcript variant 2, mRNA

agttatttcacagatgccactggggtaggtaaactgaccaactctgcagcactcagaagacgaagcaaagccttctacttgagcag
 tttttccatcactgatatgtgcaggaaatgaagacattgcctgccatgcttggactgggaaatttttgggtcttcttctaatcccat
 a**TCTGGACATCTGGAACATC**CATGGGAAAGAATCATGTGATGTACAGCTTTATATAAAGAGACAATC
 TGAACACTCCAT**CTTAGCAGGAGATCCCTTT**gaactagaatgccctgtgaaatactgtgctaacaggcctcatgtgact
 tggtgca

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCTGGACATCTGGAACATC	19	53.84	47.37	2.00	1.00
Reverse primer	AAAGGGATCTCCTGCTAAG	19	53.46	47.37	6.00	3.00

Products on target templates

>NM_001085357.2 Homo sapiens B and T lymphocyte associated (BTLA), transcript variant 2, mRNA

product length = 97
 Forward primer 1 TCTGGACATCTGGAACATC 19
 Template 180 198
 Reverse primer 1 AAAGGGATCTCCTGCTAAG 19
 Template 276 258

>NM_181780.4 Homo sapiens B and T lymphocyte associated (BTLA), transcript variant 1, mRNA

product length = 97
 Forward primer 1 TCTGGACATCTGGAACATC 19
 Template 180 198
 Reverse primer 1 AAAGGGATCTCCTGCTAAG 19
 Template 276 258

<u>BTLA.F</u>	<u>BTLA.R</u>
Name : BTLA.F	Name : BTLA.R
Primer : 5'-	Primer : 5'-
TCTGGACATCTGGAACATC-3'	AAAGGGATCTCCTGCTAAG-3'
Reverse : 3'-	Reverse : 3'-
CTACAAGGTCTACAGGTCT-5'	GAATCGTCCTCTAGGGAAA-5'
Length : 19 nt	Length : 19 nt
Tm (basic) : 56,0 °C	Tm (basic) : 56,0 °C

<p>Tm (salt) : 55,2 °C Tm (NN) : 55,8 °C</p> <p>GC % : 47,4 % dG : -37,8 kCal/mol</p> <p>3'-tail GC % : 42,9 % 3'-tail dG : -9,0 kCal/mol</p> <p>Molecular weight : 5849,8 g/mol</p> <p>1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,97 µM and contains 29,1 µg ssDNA</p> <p><u>BTLA.F self annealing:</u></p> <p>None!</p> <p><u>BTLA.F loops:</u></p> <p>None!</p>	<p>Tm (salt) : 55,2 °C Tm (NN) : 56,9 °C</p> <p>GC % : 47,4 % dG : -36,2 kCal/mol</p> <p>3'-tail GC % : 42,9 % 3'-tail dG : -9,0 kCal/mol</p> <p>Molecular weight : 5898,8 g/mol</p> <p>1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,69 µM and contains 27,7 µg ssDNA</p> <p><u>BTLA.R self annealing:</u></p> <p>5'-AAAGGGATCTCCTGCTAAG-3' : : : :</p> <p>3'-GAATCGTCCTCTAGGGAAA-5' dG: -3,30 kcal/mol</p> <p>5'-AAAGGGATCTCCTGCTAAG-3' : ::: :</p> <p>3'-GAATCGTCCTCTAGGGAAA-5' dG: -2,85 kcal/mol</p> <p>5'-AAAGGGATCTCCTGCTAAG-3' :::</p> <p>3'-GAATCGTCCTCTAGGGAAA-5' dG: -2,01 kcal/mol</p> <p><u>BTLA.R loops:</u></p> <p>5'-AAAGGGA T</p> <p>3'-GAATCGTCCTC dG: -1,59 kcal/mol</p>
<p><u>BTLA.F - BTLA.R annealing:</u></p> <p>5'-TCTGGACATCTGGAACATC-3' : :::</p> <p>3'-GAATCGTCCTCTAGGGAAA-5' dG: -2,85 kcal/mol</p> <p>5'-TCTGGACATCTGGAACATC-3' : : :</p> <p>3'-GAATCGTCCTCTAGGGAAA-5' dG: -2,85 kcal/mol</p> <p>5'-TCTGGACATCTGGAACATC-3' : : </p> <p>3'-GAATCGTCCTCTAGGGAAA-5' dG: -0,58 kcal/mol</p>	

CTLA-4 (CD152)

F: 5' TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC 3'

R: 5' TCACACACAAAGCTGGCGAT 3' / C: 3' ATCGCCAGCTTTGTGTGTGA 5'

Exon-1 Exon-2

>NM_005214.5 Homo sapiens cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA4), transcript variant 1, mRNA

tttcagcggcacaaggctcagctgaacctggctaccaggacctggcctgcactctcctgtttttct**TCTCTTCATCCCTGTCTTCT**
GCAAAGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGAGGCATCGCCAGCT
TTGTGTGTGAgtagatgcactccaggcaaagccactgaggctccgggtgacagtgtctcggcaggctgacagccagggtgactgaagtctgt
gctgcaacctacatg

>NM_001037631.3 Homo sapiens cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA4), transcript variant 2, mRNA

tttcagcggcacaaggctcagctgaacctggctaccaggacctggcctgcactctcctgtttttct**TCTCTTCATCCCTGTCTTCT**
GCAAAGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGAGGCATCGCCAGCT
TTGTGTGTGAgtagatgcactccaggcaaagccactgaggctccgggtgacagtgtctcggcaggctgacagccagggtgactgaagtctgt
gctgcaacctacatg

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC	22	59.50	50.00	2.00	2.00
Reverse primer	TCACACACAAAGCTGGCGAT	20	60.53	50.00	4.00	2.00

Products on target templates

>NM_001037631.3 Homo sapiens cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA4), transcript variant 2, mRNA

product length = 93
Forward primer 1 TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC 22
Template 256 277
Reverse primer 1 TCACACACAAAGCTGGCGAT 20
Template 348 329

>NM_005214.5 Homo sapiens cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA4), transcript variant 1, mRNA

product length = 93
Forward primer 1 TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC 22
Template 256 277
Reverse primer 1 TCACACACAAAGCTGGCGAT 20
Template 348 329

CTLA.F		CTLA.R	
Name	: CTLA.F	Name	: CTLA.R
Primer	: 5'-	Primer	: 5'-
	TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC-3'		TCACACACAAAGCTGGCGAT-3'
Reverse	: 3'-	Reverse	: 3'-
	CGTCTTCTGTCCCTACTTCTCT-5'		TAGCGGTTCGAAACACACACT-5'
Length	: 22 nt	Length	: 20 nt
Tm (basic)	: 66,0 °C	Tm (basic)	: 60,0 °C
Tm (salt)	: 62,1 °C	Tm (salt)	: 58,4 °C
Tm (NN)	: 61,6 °C	Tm (NN)	: 60,4 °C
GC %	: 50,0 %	GC %	: 50,0 %
dG	: -45,4 kCal/mol	dG	: -40,8 kCal/mol
3'-tail GC %	: 57,1 %	3'-tail GC %	: 57,1 %
3'-tail dG	: -10,4 kCal/mol	3'-tail dG	: -12,2 kCal/mol

<p>Molecular weight : 6616,3 g/mol</p> <p>1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 5,36 μM and contains 35,4 μg ssDNA</p> <p><u>CTLA.F self annealing:</u></p> <p>None!</p> <p><u>CTLA.F loops:</u></p> <p>None!</p>	<p>Molecular weight : 6157,0 g/mol</p> <p>1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,51 μM and contains 27,7 μg ssDNA</p> <p><u>CTLA.R self annealing:</u></p> <p>5'-TCACACACAAAGCTGGCGAT-3' : : 3'-TAGCGGTCGAAACACACACT-5' dG: -4,34 kcal/mol</p> <p><u>CTLA.R loops:</u></p> <p>None!</p>
<p><u>CTLA.F - CTLA.R annealing:</u></p> <p>5'-TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC-3' : : : : : 3'-TAGCGGTCGAAACACACACT-5' dG: -1,39 kcal/mol</p> <p>5'-TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC-3' : : : 3'-TAGCGGTCGAAACACACACT-5' dG: -1,39 kcal/mol</p> <p>5'-TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC-3' : : : : : 3'-TAGCGGTCGAAACACACACT-5' dG: -1,39 kcal/mol</p> <p>5'-TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC-3' : : : : 3'-TAGCGGTCGAAACACACACT-5' dG: -0,58 kcal/mol</p> <p>5'-TCTCTTCATCCCTGTCTTCTGC-3' : : : 3'-TAGCGGTCGAAACACACACT-5' dG: 0,22 kcal/mol</p>	

LAG-3 (CD223)

F: 5' GCGGGGACTTCTCGCTATG 3'

R: 5' TCAAAATGACCCAGTCCGAGG 3' / C: 3' CCTCCGACTGGGTCATTTTGA 5'

Exon-3 Exon-4

>NM_002286.6 Homo sapiens lymphocyte activating 3 (LAG3), mRNA

gccggcagc**GCGGGGACTTCTCGCTATG**GCTGCGCCAGCCCGGCGCGCGGACGCCGGCGAGTA
 CCGCGCCGCGGTGCACCTCAGGGACCGCGCCCTCTCCTGCCGCCTCCGTCTGCGCCTGGGCCA
GGCCTCGATGACTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCATTTGAactgctcc
 ttacgcccctgaccgcccagcctctgtgcattggtccggaaccggggccagggccgagtcctctgtc

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCGGGGACTTCTCGCTATG	19	60.30	63.16	5.00	0.00
Reverse primer	TCAAAATGACCCAGTCCGAGG	21	60.00	52.38	3.00	1.00

Products on target templates

>NM_002286.6 Homo sapiens lymphocyte activating 3 (LAG3), mRNA

product length = 177
 Forward primer 1 GCGGGGACTTCTCGCTATG 19
 Template 719 737
 Reverse primer 1 TCAAAATGACCCAGTCCGAGG 21
 Template 895 875

<u>LAG3.F</u>	<u>LAG3.R</u>
Name : LAG3.F	Name : LAG3.R
Primer : 5'- GCGGGGACTTCTCGCTATG-3'	Primer : 5'- TCAAAATGACCCAGTCCGAGG-3'
Reverse : 3'- GTATCGCTCTTCAGGGGCG-5'	Reverse : 3'- GGAGGCTGACCCAGTAAAACT-5'
Length : 19 nt	Length : 21 nt
Tm (basic) : 62,0 °C	Tm (basic) : 64,0 °C
Tm (salt) : 61,6 °C	Tm (salt) : 61,3 °C
Tm (NN) : 63,6 °C	Tm (NN) : 61,5 °C
GC % : 63,2 %	GC % : 52,4 %
dG : -41,0 kCal/mol	dG : -43,0 kCal/mol
3'-tail GC % : 57,1 %	3'-tail GC % : 71,4 %
3'-tail dG : -9,4 kCal/mol	3'-tail dG : -13,1 kCal/mol
Molecular weight : 5897,8 g/mol	Molecular weight : 6526,2 g/mol
1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 5,22 µM and contains 30,8 µg ssDNA	1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,19 µM and contains 27,3 µg ssDNA
<u>LAG3.F self annealing:</u>	<u>LAG3.R self annealing:</u>
5'-GCGGGGACTTCTCGCTATG-3' : : : ::	5'-TCAAAATGACCCAGTCCGAGG-3' :::
3'-GTATCGCTCTTCAGGGGCG-5' dG: -2,86 kcal/mol	3'-GGAGGCTGACCCAGTAAAACT-5' dG: -1,89 kcal/mol

<p><u>LAG3.F loops:</u></p> <p>5'-GCGGGGA : C 3'-GTATCGCTCTT dG: -2,44 kcal/mol</p>	<p>5'- TCAAAATGACCCAGTCGGAGG-3' ::: 3'-GGAGGCTGACCCAGTAAAACT-5' dG: -1,72 kcal/mol</p> <p><u>LAG3.R loops:</u></p> <p>5'-TCAAAATGACC C 3'-GGAGGCTGA dG: -1,48 kcal/mol</p>
<p><u>LAG3.F - LAG3.R annealing:</u></p> <p>5'-GCGGGGACTTCTCGCTATG-3' : : : 3'-GGAGGCTGACCCAGTAAAACT-5' dG: -3,77 kcal/mol</p> <p>5'-GCGGGGACTTCTCGCTATG-3' ::: 3'-GGAGGCTGACCCAGTAAAACT-5' dG: -3,48 kcal/mol</p> <p>5'-GCGGGGACTTCTCGCTATG-3' : : : : : 3'-GGAGGCTGACCCAGTAAAACT-5' dG: -3,48 kcal/mol</p> <p>5'-GCGGGGACTTCTCGCTATG-3' ::: 3'-GGAGGCTGACCCAGTAAAACT-5' dG: -1,38 kcal/mol</p>	

PD-L1 (CD274)

F: 5' GCCCCATACAACAAAATCAACC 3'

R: 5' GCTTGTCCAGATGACTTCGG 3' / C: 3' CCGAAGTCATCTGGACAAGC 5'

Exon 2 (v2) Exon 3 Exon 3 (v2) Exon 4

>NM_001314029.1 Homo sapiens CD274 molecule (CD274), transcript variant 4, mRNA

tgaaagtcaatGCCCCATACAACAAAATCAACC AAAGAATTTTGGTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAA
CATGAACTGACATGTCAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCATCTGGACAAGC agtgaccatc
aagtcctgagtggaagaccaccaccaattccaagagagaggagaagctttcaatgtgaccagcacactgagaatcaacacaaca
ctaattgagattttctactgcacttttaggagattagatcctgaggaaaaccatacagctgaattggtcatccc

>NM_001267706.1 Homo sapiens CD274 molecule (CD274), transcript variant 2, mRNA

ctactggcatttgctgaacGCCCCATACAACAAAATCAACC AAAGAATTTTGGTTGTGGATCCAGTCACCT
CTGAACATGAACTGACATGTCAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCATCTGGACAAGC agt
gaccatcaagtctgagtggaagaccaccaccaccaattccaagagagaggagaagctttcaatgtgaccag

>NM_014143.4 Homo sapiens CD274 molecule (CD274), transcript variant 1, mRNA

tatggtggtccgactacaagcgaattactgtgaaagtcaatGCCCCATACAACAAAATCAACC AAAGAATTTTGGTT
GTGGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACTGACATGTCAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAG
TCATCTGGACAAGC agtgaccatcaagtctgagtggaagaccaccaccaccaattccaagagagaggagaagctttcaatgtg
accagcacactgagaatcaacacaacaactaatgagattttctactgcact

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCCCATACAACAAAATCAACC	22	58.40	45.45	2.00	0.00
Reverse primer	GCTTGTCCAGATGACTTCGG	20	58.64	55.00	3.00	3.00

Products on target templates

>NM_001267706.2 Homo sapiens CD274 molecule (CD274), transcript variant 2, mRNA

product length = 114
Forward primer 1 GCCCCATACAACAAAATCAACC 22
Template 121 142
Reverse primer 1 GCTTGTCCAGATGACTTCGG 20
Template 234 215

>NM_001314029.2 Homo sapiens CD274 molecule (CD274), transcript variant 4, mRNA

product length = 114
Forward primer 1 GCCCCATACAACAAAATCAACC 22
Template 463 484
Reverse primer 1 GCTTGTCCAGATGACTTCGG 20
Template 576 557

>NM_014143.4 Homo sapiens CD274 molecule (CD274), transcript variant 1, mRNA

product length = 114
Forward primer 1 GCCCCATACAACAAAATCAACC 22
Template 463 484
Reverse primer 1 GCTTGTCCAGATGACTTCGG 20
Template 576 557

<u>PDL1 . F</u>	<u>PDL1 . R</u>
Name : PDL1.F	Name : PDL1.R
Primer : 5'-	Primer : 5'-
GCCCCATACAACAAAATCAACC-3'	GCTTGTCCAGATGACTTCGG-3'
Reverse : 3'-	Reverse : 3'-
CCAACTAAAACAACATACCCCG-5'	GGCTTCAGTAGACCTGTTCG-5'
Length : 22 nt	Length : 20 nt
Tm (basic) : 64,0 °C	Tm (basic) : 62,0 °C

<p>Tm (salt) : 60,3 °C Tm (NN) : 59,6 °C</p> <p>GC % : 45,5 % dG : -41,9 kCal/mol</p> <p>3'-tail GC % : 42,9 % 3'-tail dG : -9,7 kCal/mol</p> <p>Molecular weight : 6672,3 g/mol</p> <p>1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,09 µM and contains 27,3 µg ssDNA</p> <p><u>PDL1.F self annealing:</u></p> <p>None!</p> <p><u>PDL1.F loops:</u></p> <p>None!</p>	<p>Tm (salt) : 60,5 °C Tm (NN) : 60,1 °C</p> <p>GC % : 55,0 % dG : -40,8 kCal/mol</p> <p>3'-tail GC % : 57,1 % 3'-tail dG : -10,5 kCal/mol</p> <p>Molecular weight : 6186,0 g/mol</p> <p>1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,92 µM and contains 30,4 µg ssDNA</p> <p><u>PDL1.R self annealing:</u></p> <p>5'-GCTTGTCCAGATGACTTCGG-3' : : : 3'-GGCTTCAGTAGACCTGTTCG-5' dG: -1,89 kcal/mol</p> <p><u>PDL1.R loops:</u></p> <p>5'-GCTTGTCCA G 3'-GGCTTCAGTA dG: -1,48 kcal/mol</p>
<p><u>PDL1.F - PDL1.R annealing:</u></p> <p>5'-GCCCCATACAACAAAATCAACC-3' : 3'-GGCTTCAGTAGACCTGTTCG-5' dG: -2,51 kcal/mol</p> <p>5'-GCCCCATACAACAAAATCAACC-3' : 3'-GGCTTCAGTAGACCTGTTCG-5' dG: -2,51 kcal/mol</p> <p>5'-GCCCCATACAACAAAATCAACC-3' : : : : 3'-GGCTTCAGTAGACCTGTTCG-5' dG: -1,72 kcal/mol</p> <p>5'-GCCCCATACAACAAAATCAACC-3' : : 3'-GGCTTCAGTAGACCTGTTCG-5' dG: -0,58 kcal/mol</p> <p>5'-GCCCCATACAACAAAATCAACC-3' : : : : : 3'-GGCTTCAGTAGACCTGTTCG-5' dG: -0,11 kcal/mol</p> <p>5'-GCCCCATACAACAAAATCAACC-3'</p>	

||| ::
3'-GGCTTCAGTAGACCTGTTTCG-5'
dG: -0,08 kcal/mol

PD-L2 (PDCD1LG2)

F1: 5' ACCCAGGACCCATCCAACCTT 3'

R1: 5' ACCACAGGTTTCAGATAGCACT 3' / C: 3' AGTGCTATCTGAACCTGTGGT 5'

Exon-5 Exon-6 Exon-7

>NM_025239.3 Homo sapiens programmed cell death 1 ligand 2 (PDCD1LG2), mRNA
 gtcagatgga**ACCCAGGACCCATCCAACCTT**GGCTGCTTCACATTTTCATCCCCTTCTGCATCATTGCT
 TTCATTTTCATAGCCACAGTGATAGCCCTAAGAAAACAACCTCTGTCAAAGCTGTATTCTTCAAAA
 GACACAACAAAAAGACCTGTCACCACAACAAGAGGGGAAGTGAAC**AGTGCTATCTGAACCTGTG**
GTcttgggagccagggtgacctgatatgacatctaagaagcttctgga

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACCCAGGACCCATCCAACCTT	20	60.78	55.00	3.00	3.00
Reverse primer	ACCACAGGTTTCAGATAGCACT	21	58.74	47.62	3.00	2.00

Products on target templates

>NM_025239.4 Homo sapiens programmed cell death 1 ligand 2 (PDCD1LG2), mRNA

```
product length = 190
Forward primer 1 ACCCAGGACCCATCCAACCTT 20
Template 929 ..... 948
Reverse primer 1 ACCACAGGTTTCAGATAGCACT 21
Template 1118 ..... 1098
```

<u>PDL2.F</u>	<u>PDL2.R</u>
Name : PDL2.F	Name : PDL2.R
Primer : 5'- ACCCAGGACCCATCCAACCTT-3'	Primer : 5'- ACCACAGGTTTCAGATAGCACT-3'
Reverse : 3'- TTCAACCTACCCAGGACCCA-5'	Reverse : 3'- TCACGATAGACTTGGACACCA-5'
Length : 20 nt	Length : 21 nt
Tm (basic) : 62,0 °C	Tm (basic) : 62,0 °C
Tm (salt) : 60,5 °C	Tm (salt) : 59,4 °C
Tm (NN) : 64,5 °C	Tm (NN) : 61,3 °C
GC % : 55,0 %	GC % : 47,6 %
dG : -43,2 kCal/mol	dG : -42,2 kCal/mol
3'-tail GC % : 42,9 %	3'-tail GC % : 42,9 %
3'-tail dG : -8,9 kCal/mol	3'-tail dG : -10,3 kCal/mol
Molecular weight : 6052,9 g/mol	Molecular weight : 6461,2 g/mol
1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,91 µM and contains 29,7 µg ssDNA	1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,34 µM and contains 28,1 µg ssDNA
<u>PDL2.F self annealing:</u>	<u>PDL2.R self annealing:</u>
5'-ACCCAGGACCCATCCAACCTT-3' : :::	5'- ACCACAGGTTTCAGATAGCACT-3' :::
3'-TTCAACCTACCCAGGACCCA-5' dG: -2,85 kcal/mol	3'-TCACGATAGACTTGGACACCA-5' dG: -2,52 kcal/mol

<p><u>PDL2.F loops:</u></p> <p>5'-ACCCAGGACC :) 3'-TTCAACCTAC dG: -2,43 kcal/mol</p>	<p><u>PDL2.R loops:</u></p> <p>None!</p>
<p><u>PDL2.F - PDL2.R annealing:</u></p> <p>5'-ACCCAGGACCCATCCAACCTT-3' : : : 3'-TCACGATAGACTTGGACACCA-5' dG: -2,52 kcal/mol</p> <p>5'-ACCCAGGACCCATCCAACCTT-3' : 3'-TCACGATAGACTTGGACACCA-5' dG: -2,52 kcal/mol</p> <p>5'-ACCCAGGACCCATCCAACCTT-3' : : : 3'-TCACGATAGACTTGGACACCA-5' dG: -0,58 kcal/mol</p> <p>5'-ACCCAGGACCCATCCAACCTT-3' :: : : 3'-TCACGATAGACTTGGACACCA-5' dG: -0,29 kcal/mol</p>	

TIM-3 (HAVCR2)

F: 5' CTTTCCAAGGATGCTTACCAC 3'

R: 5' CAGATCCCTGCTCCGATGTA 3' / C: 3' TACATCGGAGCAGGGATCTG 5'

Exon-3 Exon-4 Exon-5

>NM_032782.5 Homo sapiens hepatitis A virus cellular receptor 2 (HAVCR2), mRNA

agacttcactgcagc**CTTTCCAAGGATGCTTACCACC**CAGGGGACATGGCCCAGCAGAGACACAGACAC
TGGGGAGCCTCCCTGATATAAATCTAACACAAAATATCCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCT
 AGATTGGCCAATGACTTACGGGACTCTGGAGCAACCATCAGAATAGGCATCT**TACATCGGAGCAG**
GGATCTGtgctgggctggctctggctcttatcttcg

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTTTCCAAGGATGCTTACCAC	21	56.87	47.62	6.00	1.00
Reverse primer	CAGATCCCTGCTCCGATGTA	20	58.87	55.00	4.00	2.00

Products on target templates
 >NM_032782.5 Homo sapiens hepatitis A virus cellular receptor 2 (HAVCR2), mRNA

product length = 189
 Forward primer 1 CTTTCCAAGGATGCTTACCAC 21
 Template 502 522
 Reverse primer 1 CAGATCCCTGCTCCGATGTA 20
 Template 690 671

TIM3.F	TIM3.R
Name : TIM3.F	Name : TIM3.R
Primer : 5'- CTTTCCAAGGATGCTTACCAC-3'	Primer : 5'- CAGATCCCTGCTCCGATGTA-3'
Reverse : 3'- CACCATTTCGTAGGAACCTTTC-5'	Reverse : 3'- ATGTAGCCTCGTCCCTAGAC-5'
Length : 21 nt	Length : 20 nt
Tm (basic) : 62,0 °C	Tm (basic) : 62,0 °C
Tm (salt) : 59,4 °C	Tm (salt) : 60,5 °C
Tm (NN) : 58,8 °C	Tm (NN) : 61,8 °C
GC % : 47,6 %	GC % : 55,0 %
dG : -40,1 kCal/mol	dG : -42,0 kCal/mol
3'-tail GC % : 42,9 %	3'-tail GC % : 42,9 %
3'-tail dG : -9,6 kCal/mol	3'-tail dG : -8,8 kCal/mol
Molecular weight : 6403,1 g/mol	Molecular weight : 6114,9 g/mol
1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,72 µM and contains 30,2 µg ssDNA	1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 5,00 µM and contains 30,5 µg ssDNA
<u>TIM3.F self annealing:</u>	<u>TIM3.R self annealing:</u>
5'- CTTTCCAAGGATGCTTACCAC-3' ::: 3'-CACCATTTCGTAGGAACCTTTC-5' dG: -2,85 kcal/mol	5'- CAGATCCCTGCTCCGATGTA-3' 3'-ATGTAGCCTCGTCCCTAGAC-5' dG: -3,30 kcal/mol

<p style="text-align: center;">5'- CTTTCCAAGGATGCTTACCAC-3' ::: 3'-CACCATTCGTAGGAACCTTTC-5' dG: 0,22 kcal/mol</p> <p>5'-CTTTCCAAGGATGCTTACCAC-3' : :: ::: : 3'-CACCATTCGTAGGAACCTTTC-5' dG: 0,22 kcal/mol</p> <p><u>TIM3.F loops:</u></p> <p>5'-CTTTCCAAGGA :) 3'-CACCATTCGT dG: 0,64 kcal/mol</p>	<p style="text-align: center;">5'- CAGATCCCTGCTCCGATGTA-3' ::: 3'-ATGTAGCCTCGTCCCTAGAC-5' dG: -0,88 kcal/mol</p> <p>5'-CAGATCCCTGCTCCGATGTA-3' : :: ::: : 3'-ATGTAGCCTCGTCCCTAGAC-5' dG: -0,58 kcal/mol</p> <p><u>TIM3.R loops:</u></p> <p style="text-align: center;">5'-CAGAT) 3'-ATGTAGCCTCGTCCC dG: -0,46 kcal/mol</p> <p>5'-CAGATCCCTG :) 3'-ATGTAGCCTC dG: -0,17 kcal/mol</p>
<p><u>TIM3.F - TIM3.R annealing:</u></p> <p style="text-align: center;">5'-CTTTCCAAGGATGCTTACCAC-3' : :: 3'-ATGTAGCCTCGTCCCTAGAC-5' dG: -3,93 kcal/mol</p> <p>5'-CTTTCCAAGGATGCTTACCAC-3' : : 3'-ATGTAGCCTCGTCCCTAGAC-5' dG: -2,85 kcal/mol</p> <p style="text-align: center;">5'-CTTTCCAAGGATGCTTACCAC-3' :: 3'-ATGTAGCCTCGTCCCTAGAC-5' dG: -2,01 kcal/mol</p> <p>5'-CTTTCCAAGGATGCTTACCAC-3' : 3'-ATGTAGCCTCGTCCCTAGAC-5' dG: -0,54 kcal/mol</p>	

VISTA (VSIR)

F: 5' TCATCCTGCTCCTGGTCTACA 3'

R: 5' TCCCTTGAATGTTGCTGTCCA 3' / C: 3' TGGACAGCAACATTCAAGGGA 5'

Exon-4 Exon-5 Exon-6

>NM_022153.2 Homo sapiens V-set immunoregulatory receptor (VSIR), mRNA

acatcacgggtgcagccctggctacgggtgctgcatcgttaggaatcctctgcctccccc**TCATCCTGCTCCTGGTCTACAAG**
CAAAGGCAGGCAGCCTCCAACCGCCGTGCCAGGAGCTGGTGCGGATGGACAGCAACATTCAA
GGGATTGaaaaccccgctttgaagcctc

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCATCCTGCTCCTGGTCTACA	21	59.99	52.38	3.00	2.00
Reverse primer	TCCCTTGAATGTTGCTGTCCA	21	59.86	47.62	3.00	2.00

Products on target templates

>NM_022153.2 Homo sapiens V-set immunoregulatory receptor (VSIR), mRNA

```
product length = 90
Forward primer 1 TCATCCTGCTCCTGGTCTACA 21
Template       710 ..... 730
Reverse primer 1 TCCCTTGAATGTTGCTGTCCA 21
Template       799 ..... 779
```

<u>VISTA.F</u>	<u>VISTA.R</u>
Name : VISTA.F	Name : VISTA.R
Primer : 5'- TCATCCTGCTCCTGGTCTACA-3'	Primer : 5'- TCCCTTGAATGTTGCTGTCCA-3'
Reverse : 3'- ACATCTGGTCTCCTGCTCCTACT-5'	Reverse : 3'- ACCTGTCGTTGTAAGTTCCCT-5'
Length : 21 nt	Length : 21 nt
Tm (basic) : 64,0 °C	Tm (basic) : 62,0 °C
Tm (salt) : 61,3 °C	Tm (salt) : 59,4 °C
Tm (NN) : 63,3 °C	Tm (NN) : 60,7 °C
GC % : 52,4 %	GC % : 47,6 %
dG : -45,1 kCal/mol	dG : -42,8 kCal/mol
3'-tail GC % : 42,9 %	3'-tail GC % : 57,1 %
3'-tail dG : -9,7 kCal/mol	3'-tail dG : -11,6 kCal/mol
Molecular weight : 6370,1 g/mol	Molecular weight : 6425,2 g/mol
1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 5,08 µM and contains 32,4 µg ssDNA	1 ml of the primer solution with an absorbance of 1 at 260 nm is 4,92 µM and contains 31,6 µg ssDNA
<u>VISTA.F self annealing:</u>	<u>VISTA.R self annealing:</u>
None!	None!
<u>VISTA.F loops:</u>	<u>VISTA.R loops:</u>
None!	None!

<u>VISTA.F - VISTA.R annealing:</u>	
5'-TCATCCTGCTCCTGGTCTACA-3'	
: ::	
3'-ACCTGTCGTTGTAAGTTCCT-5'	
dG: -2,35 kcal/mol	
5'-TCATCCTGCTCCTGGTCTACA-3'	
3'-ACCTGTCGTTGTAAGTTCCT-5'	
dG: -1,72 kcal/mol	
5'-TCATCCTGCTCCTGGTCTACA-3'	
: :	
3'-ACCTGTCGTTGTAAGTTCCT-5'	
dG: -1,39 kcal/mol	
5'-TCATCCTGCTCCTGGTCTACA-3'	
:	
3'-ACCTGTCGTTGTAAGTTCCT-5'	
dG: -1,39 kcal/mol	
5'-TCATCCTGCTCCTGGTCTACA-3'	
:	
3'-ACCTGTCGTTGTAAGTTCCT-5'	
dG: -0,08 kcal/mol	

12. Anexos

12.1 Anexo I

Reagent or Resource	Source//Manufacturer	Identifier / Reference
Assay kits		
Wizard Genomic DNA Purification	Promega	A1120
SuperScript™ IV Reverse Transcriptase	ThermoFisher	18090010
Cell lines		
Akata	Dept. Infectious Diseases, Harvard Uni	RRID #CVCL_0148
BC-1	Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell University, NYC	RRID #CVCL_1079
IBL-1	Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell University, NYC	RRID #CVCL_9638
Jiyoye	Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell University, NYC	RRID #CVCL_1317
Jurkat	Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell University, NYC	RRID #CVCL_0065
MCF-7	Dept. Microbiology and Immunology, UNESP, Botucatu	RRID #CVCL_0031
MDA-MB-231	Dept. Microbiology and Immunology, UNESP, Botucatu	RRID #CVCL_0062
Mutu 1	Dept. Infectious Diseases, Harvard Uni	RRID #CVCL_7202
NP69SV40T	Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell University, NYC	RRID #CVCL_F755
PC-3	Dept. Structural and Functional Biology, UNESP, Botucatu	RRID #CVCL_0035
Rael	Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell University, NYC	RRID #CVCL_7208
Ramos	Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell University, NYC	RRID #CVCL_0597
SaOS-2	Faculdade Odontologia Bauru, Bauru	RRID #CVCL_0548
THP-1	IBTEC, UNESP, Botucatu	RRID #CVCL_0006

Proteínas LMP1 e RPMS1 do EBV na regulação de checkpoints imunitários

Reagent or Resource	Source//Manufacturer	Identifier / Reference
Chemicals, peptides, recombinant proteins		
Lipofectamine 3000 Transfection Reagent	Thermo Fisher	L3000015
Trizol	Thermo Fisher	15596026
Chloroform	Sigma-Aldrich (Merck)	CAS-67-66-3
Oligonucleotides, RNAi		
dsiRNARPMS1_1	IDT	F: GCAGGAUAUCUGCAGGAUCAGGUC R: UGCGUCCUAUAGACGUCCUAGUCCAGU
dsiRNARPMS1_2	IDT	F: GAGGACGCAGGAUAUCUGCAGGATC R: GUCUCCUGCGUCCUAUAGACGUCCUAG
18S	Sigma	F:CGAAAGCATCTTGAGAGC R:TCGAGCCAAACGGTGAAC
RPS13	Sigma	F:AGAAACGGCTACCACAA R:CACCAGACTTGCCCTCA
HSP90	Sigma	F:TCTGGGTATCGGAAAGCAAC R:GTGCACTTCTCAGGCATCG
HPRT	Thermofisher	F: AGATGGTCAAGGTCGCAAGC R: GGACTCCAGATGTTCCAACTCAAC
EBV LMP1	Sigma	F:CGTTATGAGTGACTGGACTA R:TGAACAGCACAATTCCAAGG
EBV RPMS1	Sigma	F: CATGGCCGGAGCTCGTCGAC R: CACCATGGCCGGAGCTCGTCGAC
B7-H3	Thermofisher	F:GCTTTCGTGTGCTGGAGA R:GGTCCTCATGGTCAGGCT
B7-H4	Thermofisher	F: CTTCTGCCTCTCAGCCCTTA R: GAAATAGTTCTGTAGATCCCTGTTG
BTLA	Thermofisher	F:TCTGGACATCTGGAAC R:AAAGGGATCTCCTGCG
CTLA-4	Thermofisher	F:TCTCTTCATCCCTGTCTTC R:TCACACACAAAGCTGGCT
LAG-3	Thermofisher	F:GCGGGGACTTCTCGCTAG R:TCAAATGACCCAGTCGG
PD-L1	Sigma	F:GCCCCATACAACAAATCC R:GCTTGTCAGATGACTTG
PD-L2	Thermofisher	F:ACCCAGGACCCATCCAATT R:ACCACAGGTTTCAGATAGT
TIM-3	Thermofisher	F:CTTCCAAGGATGCTTACC R:CAGATCCCTGCTCCGATTA
VISTA	Thermofisher	F:TCATCCTGCTCCTGGTCTA R:TCCCTGAATGTTGCTGTA

Plasmids		
PMax-GFP	Amaxa-Lonza	VDC-1040
pcDNA3.1/Hygro(+)	Invitrogen	V87020
pEF1 α -IRES-ZsGreen1	Clontech	V011161
pZsGLMP1_B95-8	IBTEC, UNESP, Botucatu	Muller-Coan, 2016
pcDNARPMS1	Dept. Infectious Diseases, Imperial College	
Software		
OligoExplorer	GeneLink, Inc.	v.1.1
OligoAnalyzer	GeneLink, Inc.	v.1.2
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.	Prism 9.0.0 (121)