



**unesp**

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



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

**“Estabelecimento de modelo *in vitro* para estudo de efeitos de miR-  
BARTs do EBV em células humanas de epitélio nasofaríngeo”**

**VIVIANA LOUREIRO ROCHA**

**Mestranda**

**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, Área de concentração de Biologia Celular Estrutural e Funcional. Trabalho desenvolvido junto ao ViriCan, grupo de pesquisa do Instituto de Biotecnologia (IBTEC).

**Botucatu, SP**  
**junho de 2022**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**Estabelecimento de modelo *in vitro* para estudo de efeitos de miR-  
BARTs do EBV em células humanas de epitélio nasofaríngeo**

**VIVIANA LOUREIRO ROCHA**

**Mestranda**

**DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA**

**Orientador**

**Botucatu, SP**

**junho de 2022**

R672e Rocha, Viviana Loureiro  
Estabelecimento de modelo in vitro para estudo de efeitos de miR-BARTs do EBV em células humanas de epitélio nasofaríngeo / Viviana Loureiro Rocha. -- Botucatu, 2022  
70 p.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu  
Orientador: Deilson Elgui de Oliveira  
1. Carcinogênese. 2. MicroRNAs. 3. Herpesvírus humano. 4. Técnicas in vitro. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **Agradecimentos**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.466765/2019-00 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Código de Financiamento 2017/23393-9.

Agradeço ao meu orientador, Professor Deilson, pela oportunidade, apoio e compreensão durante todo o período de estudo.

Agradeço ao IBTEC e todos os membros, que contribuíram muito para o desenvolvimento e finalização desse trabalho.

Agradeço aos amigos feitos em Botucatu, em especial Bárbara, Beatrice, Brayan, Bruno, Felipe e Guto, que estiveram sempre presentes e sempre gentis em todos os momentos que precisei de ajuda.

Agradeço aos amigos de longa data, que me apoiaram em todos os momentos, independente da distância.

Agradeço ao Maycon, que durante todo o tempo que morei em Botucatu, me recebeu com todo amor e carinho.

Agradeço a minha família, em especial minha irmã Giovana e minha mãe Vilma, que são minha base.

Agradeço especialmente minha mãe, que esteve presente e me apoiando, em todos os momentos.

---

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>15</b>
1.1	Cânceres associados ao EBV .....	16
1.2	Vírus de Epstein-Barr .....	17
1.3	microRNAs e carcinogênese .....	19
1.4	EBV, miRNA e carcinogênese .....	21
<b>2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>25</b>
2.1	Objetivo geral .....	25
2.2	Objetivos específicos.....	25
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>26</b>
3.1	Linhagens celulares .....	27
3.2	Indução de ciclo lítico do EBV .....	29
3.3	Infecção de linhagem celular derivada de epitélio de nasofaringe.....	32
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>35</b>
4.1	Indução de ciclo lítico e quantificação de partículas virais.....	35
4.2	Efeitos da infecção pelo EBV em células NP69 <sup>SV40T</sup> .....	38
<b>5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Apêndice .....</b>	<b>56</b>
8.1	Preâmbulo.....	56
8.2	Construção de vetores de RNAs-guia para edição CRISPR/Cas9 .....	57
8.3	Construtos de gRNA para edição de miR-BARTs 7 e 9.....	61
8.4	Recursos de pesquisa.....	68

---

## Lista de Abreviações

Abreviação	Definição por extenso	Em inglês, quando couber
<b>ATM</b>	Proteínas mutadas de ataxia telangiectasia	<i>Ataxia telangiectasia mutated protein</i>
<b>BAC</b>	Cromossomo artificial bacteriano	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
<b>BART</b>	Transcritos à montante de BamHI-A	<i>BamHI-A rightward transcripts</i>
<b>BCR</b>	Receptor de célula B	<i>B cell receptor</i>
<b>BHRF1</b>	Quadro aberto para leitura à montante do fragmento H de BamHI	<i>BamHI fragment H rightward open reading frame 1</i>
<b>BL</b>	Linfoma de Burkitt	<i>Burkitt lymphoma</i>
<b>Cas9</b>	Proteína 9 associada à CRISPR	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
<b>CD40</b>	Cluster de diferenciação 40	<i>Cluster of differentiation 40</i>
<b>CR2/CD21</b>	Receptor 2 para fragmento do complemento	<i>Complement receptor 2</i>
<b>CRISPR</b>	Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
<b>DPBS</b>	Solução fosfato-salina modificada por Dulbecco	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<b>EBER</b>	Pequenos RNAs codificados pelo EBV	<i>EBV encoded small RNA</i>
<b>EBV</b>	Vírus de Epstein-Barr	<i>Epstein-Barr virus</i>
<b>EBNA</b>	Antígenos nucleares do EBV	<i>EBV encoded nuclear antigens</i>
<b>EMT</b>	Transição epitelial-mesenquimal	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino	<i>Fetal bovine serum</i>
<b>FISH</b>	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
<b>GFP</b>	Proteína fluorescente verde	<i>Green fluorescent protein</i>

<b>Abreviação</b>	<b>Definição por extenso</b>	<b>Em inglês, quando couber</b>
<b>gRNA</b>	RNA guia	<i>Guide RNA</i>
<b>HBV</b>	Vírus da hepatite B	<i>Hepatitis B virus</i>
<b>HCV</b>	Vírus da hepatite C	<i>Hepatitis C virus</i>
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência adquirida humana	<i>Human immunodeficiency Virus</i>
<b>HL</b>	Linfoma de Hodgkin	<i>Hodgkin lymphoma</i>
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitário humano	<i>Human leukocyte antigen</i>
<b>HPV</b>	Papilomavírus humano	<i>Human papillomavirus</i>
<b>HTLV-1</b>	Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1	<i>Human T lymphotropic virus 1</i>
<b>KSHV</b>	Vírus humano do sarcoma de Kaposi	<i>Kaposi's sarcoma human virus</i>
<b>LMP1</b>	Proteína latente de membrana	<i>Latent membrane protein</i>
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógenos	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MCPV</b>	Poliomavírus de células de Merkel	<i>Merkel cell polyomavirus</i>
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>miR/miRNA</b>	microRNA	<i>microRNA</i>
<b>MOI</b>	Multiplicidade de infecção	<i>Multiplicity of infection</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro	<i>Messenger RNA</i>
<b>ncRNA</b>	RNAs não codificantes	<i>Non-coding RNAs</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
<b>NK</b>	Células matadoras naturais	<i>Natural killers</i>
<b>NPC</b>	Carcinoma de nasofaringe	<i>Nasopharyngeal carcinoma</i>
<b>NSCLC</b>	Carcinoma pulmonar de células não pequenas	<i>Non-small cell lung cancer</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PKC</b>	Proteína quinase C	<i>Protein kinase C</i>
<b>PTEN</b>	Proteína fosfatase PTEN	<i>PTEN protein phosphatase</i>
<b>qPCR</b>	PCR quantitativo	<i>Quantitative PCR</i>

---

<b>Abreviação</b>	<b>Definição por extenso</b>	<b>Em inglês, quando couber</b>
<b>RISC</b>	Complexo de inativação induzido por RNA	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>RPS18</b>	Proteína ribossomal 18S	<i>Ribosomal protein 18S</i>
<b>SB</b>	Butirato de sódio	<i>Sodium butyrate</i>
<b>STR</b>	Repetições curtas em tandem	<i>Short tandem repeats</i>
<b>TRAIL</b>	Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
<b>TPA</b>	Acetato de tetradecanoilforbol	<i>12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>

---



## Listas de Figuras, Quadros e Tabelas

- Figura 1:** Representação do genoma do EBV com destaque para as regiões BHRF1 e BART (*clusters* 1 e 2), onde são codificados a maioria dos miRNAs virais. Reproduzido de Barth et al. 2011 (Barth, Meister, e Grässer 2011). ..... 22
- Figura 2:** Delineamento experimental, indicando o estabelecimento dos protocolos de produção de partículas virais e infecção de células epiteliais. .... 26
- Figura 3:** Análise por qPCR da expressão de genes de ciclo lítico do EBV em células Akata-Cas9 infectadas pelo vírus e tratadas com 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) 20ng/mL e butirato de sódio (SB) 3mM. (A) EBV BZLF1, que codifica o transcrito Zta, expresso precocemente durante o ciclo lítico viral; (B) EBV BLLF1, que codifica gp350, expresso tardiamente no ciclo lítico. Expressão relativa em relação ao controle negativo (C-), que corresponde a células sem indução de ciclo lítico (i.e., não-tratadas com os compostos químicos indicados). ..... 35
- Figura 4:** Curva de amplificação linear do gene BGLF5 do EBV por qPCR, evidenciando o número de cópias de genoma viral correspondente às diferentes quantidades de vetor (genoma da variante B95-8 do EBV - Advanced Biotechnologies) utilizadas. .... 36
- Figura 5:** Relação entre massa genômica (ng) e ciclo limiar médio (Ct) gerada com base em resultados de amplificação do gene BGLF5 do EBV por qPCR empregando diluições seriadas de DNA genômico do genótipo viral B95-8. A equação indicada foi empregada para cálculo da quantidade de partículas virais obtidas nos experimentos de indução de replicação lítica viral. .... 37
- Figura 6:** Estimativa do número de partículas do EBV (baseada em resultados de amplificação do gene viral BGLF5 por qPCR) no sobrenadante de células Akata-Cas9 infectadas e tratadas para indução de ciclo lítico com 20ng/mL de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) + 3mM de butirato de sódio (SB), ou com anticorpo anti-IgG (Fab) humana nas concentrações de 10, 20 ou 30µg/mL. Dados normalizados com base no nº de partículas/µL de sobrenadante em amostra sem tratamento com DNase e proteinase K. Resultados de um único experimento. .... 38
- Figura 7:** Estimativa da eficiência de infecção pelo EBV de células NP69<sup>SV40T</sup> *in vitro*, os eixos Y dos gráficos estão em escala logarítmica. À esquerda, estimativa baseada no número de cópias do genoma viral por µL de reação (estimada pela quantificação de cópias do gene viral BGLF5 por qPCR). À direita, quantificação relativa do número de cópias do gene BGLF5 do EBV em relação ao número de cópias do gene TNF- $\alpha$  (pTNF- $\alpha$  -862) em células NP69<sup>SV40T</sup> infectadas com as diferentes quantidades de vírus, indicando valores de duas réplicas técnicas e sua média. Dados referentes à um experimento. .... 39
- Figura 8:** Curva de amplificação linear de qPCR para o gene BGLF5 do EBV a partir de DNA total extraído de células NP460<sup>hTert</sup> em amostras submetidas ao sobrenadante derivado de células Akata-
-

Cas9 infectadas, contendo partículas virais livre (EBV+) e sobrenadante de células não-infectadas, como controle negativo (NC). Dados referentes à um experimento. .... 40

**Figura 9:** Avaliação do número de cópias do genoma do EBV baseada no número de cópias do gene BGLF5 estimada por qPCR, os eixos Y dos gráficos estão em escala logarítmica. À esquerda, estimativa da quantidade de partículas virais obtidas no sobrenadante de células Akata-Cas9 infectadas com EBV após indução química do ciclo lítico. Quantidade de partículas normalizada pelo número de partículas/ $\mu$ L de sobrenadante não-tratado com DNase e proteinase K. As quantidades estimadas de partículas obtidas são descritas a seguir: EBV WT  $1,07 \times 10^6$  partículas/ $\mu$ L, com comprometimento do miR-BART7 (EBV  $\Delta$ miR-BART-7sg2)  $1,1 \times 10^5$  partículas/ $\mu$ L, e com comprometimento do miR-BART9 (EBV  $\Delta$ miR-BART-9sg2)  $3,7 \times 10^5$  partículas/ $\mu$ L. Os gráficos intermediário e da direita apresentam a estimativa de cópias do gene BGLF5 do EBV em células NP69<sup>SV40T</sup> em 24h e 120h pós-infecção, respectivamente, comparativamente ao resultado obtido nas células infectadas com partículas do EBV sem edição dos miR-BARTs (EBV WT). Resultados ponderados pelos respectivos valores de MOI, de forma a permitir comparação entre os grupos. Dados referentes à um experimento. .... 41

**Figura 10:** Ensaio utilizando o reagente brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) nas células NP69SV40T infectadas com partículas virais na forma selvagem (WT) ou com edição dos miR-BARTs 7 (EBV  $\Delta$ miR-BART-7sg2) ou 9 (EBV  $\Delta$ miR-BART-9sg2) nos tempos 72h, 96h e 120h após a infecção das células. As células foram semeadas em placas de 96 poços 24h após a infecção, após 24h foram privadas de soro fetal bovino (FBS) (48h pós infecção), e então após 24h, (72h pós infecção) foi iniciada a primeira leitura do ensaio de MTT. Absorbância relativa calculada após normalização em relação a células NP69SV40T não infectadas e expressa em forma percentual. Dados referentes à um experimento com três replicatas técnicas, no gráfico são mostradas as replicatas técnicas, média e desvio padrão. .... 42

**Quadro 1:** Programas de latência do EBV, definidos de acordo com os principais produtos virais expressos (Heslop 2009; Kang e Kieff 2015; Thorley-Lawson e Gross 2004)..... 18

**Quadro 2:** Perfis de STR obtidos na autenticação das linhagens empregadas no estudo ..... 28

**Quadro 3:** Condições experimentais de qPCR para verificação de indução de ciclo lítico e quantificação de partículas virais. .... 31

**Quadro 4:** Condições de qPCR para verificação de infecção e quantificação de partículas virais. 33

**Quadro 5:** Correspondência entre massa genômica viral (ng), valor de Ct obtido para o gene BGLF5 do EBV (qPCR) e número de cópias do genoma viral calculado para cada ponto da curva-padrão para estimativa de número de partículas virais nos experimentos de indução de replicação lítica. . 36

- Figura Suplementar 1:** Mapa do vetor pLV-gRNA-miR-BART7, construído utilizando o software Geneious. O mapa contém anotações da sequência dos gRNAs e das estruturas necessárias para sua expressão. .... 60
- Figura Suplementar 2:** Mapa do vetor pLV-gRNA-miR-BART9, construído utilizando o software Geneious. O mapa contém anotações da sequência dos gRNAs e das estruturas necessárias para sua expressão. .... 61
- Figura Suplementar 3:** Ilustração da clonagem dos gRNAs para miR-BART7 e miR-BART9 no vetor pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr. São descritas as sequências dos gRNAs, na coluna central, e as sequências das extremidades coesivas da enzima *BsmBI* que foram adicionadas às sequências dos gRNAs, nas colunas laterais. .... 63
- Figura Suplementar 4:** Gel de agarose 1% contendo o produto da PCR de confirmação da ligação para os vetores pLV-gRNA-miR-BART7 e pLV-gRNA-miR-BART9. O vetor vazio foi utilizado como controle do experimento, para verificar quanto à presença de recircularização do vetor digerido usado na ligação. O produto gerado apresenta 643pb. .... 64
- Figura Suplementar 5:** Gel de agarose 1% contendo o produto do PCR colony. Para cada construto são mostradas colônias bacterianas, sendo as colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11 e 12 positivas para a presença do vetor pLV-gRNA-miR-BART7, e as colônias 3, 8, 9 e 11 positivas para o vetor pLV-gRNA-miR-BART9, devido a banda de aproximadamente 650pb, tamanho próximo ao esperado (643pb). .... 65
- Figura Suplementar 6:** Gel de agarose 1% contendo o produto da PCR de confirmação de purificação plasmidial dos construtos pLV-gRNA-miR-BART7 e pLV-gRNA-miR-BART9. As bandas apresentam tamanho aproximado de 650pb, tamanho similar ao amplicon gerado (643pb). .... 66
- Figura Suplementar 7:** Eletroferogramas do sequenciamento dos amplicons gerados por PCR com os iniciadores gSeq.R e hU6.F e alinhamentos empregando como referência os construtos planejados pLV-DsRed-gRNA-BART7 e pLV-DsRed-gRNA-BART9. Estão evidenciadas a presença da sequência integral e a orientação correta de inserção dos gRNAs para edição de miR-BARTs 7 e 9 no vetor-base pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr, resultado que valida geração dos respectivos construtos lentivirais. .... 66
- Figura Suplementar 8:** Curva de amplificação linear do gene BGLF5 do EBV por qPCR utilizando amostras de sobrenadante celular de células Akata-Cas9 tratado com DNase (DNase) e controle negativo (NC) (legendas em vermelho), verificando a presença de DNA viral livre no sobrenadante celular após indução de ciclo lítico (TPA+SB) e controle negativo (NC). .... 68
-

---

<b>Quadro Suplementar 1:</b> Discriminação de condições experimentais da clonagem dos vetores pLV-DsRed-gRNA-miR-BART7 e pLV-DsRed-gRNA-miR-BART9.....	58
<b>Quadro Suplementar 2:</b> Condições experimentais de PCR de confirmação de ligação, PCR de colônia e PCR de confirmação de miniprep.....	59
<b>Quadro Suplementar 3:</b> Sequências e escores de gRNAs para <i>knockout</i> de miR-BARTs 7 e 9 no genoma do EBV. ....	61
<b>Quadro Suplementar 4:</b> Concentrações e razões de pureza do DNA obtido na extração plasmidial das colônias selecionadas.....	65
<b>Quadro Suplementar 5:</b> Recursos e reagentes.....	69
<b>Quadro Suplementar 6:</b> Iniciadores.....	70

---

## **Resumo**

A infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) está associada a alguns tipos de cânceres, como o linfoma de Burkitt (BL) e o carcinoma de nasofaringe (NPC). O EBV é ubíquo e infecta, de forma latente, a maioria da população adulta. A latência biológica do EBV é caracterizada por elevada restrição na expressão de produtos virais, sendo limitada a poucas proteínas e RNAs não codificantes, como os miR-BARTs. A superexpressão de miR-BART 7 no NPC regula a expressão do produto do gene supressor tumoral PTEN. O miR-BART 9, por sua vez, regula a expressão da oncoproteína viral LMP1 e de caderina E celular. A regulação da expressão destas proteínas sugere papel dos miR-BARTs 7 e 9 no fenômeno de transição epitelial-mesenquimal (EMT), importante para progressão de cânceres de origem epitelial. Dessa forma, este estudo tem como objetivo a criação de um modelo experimental para verificar o papel exercido por miR-BART 7 e miR-BART 9 na aquisição de características favoráveis a carcinogênese. O modelo estabelecido baseia-se em células de epitélio de nasofaringe infectadas com partículas virais selvagens ou mutadas para estes miRNAs. A construção deste modelo emprega a tecnologia CRISPR/Cas9 para edição do genoma do EBV em células Akata-EBV+. As células Akata-EBV+ com genoma selvagem ou mutado foram quimicamente tratadas para ativação de ciclo lítico, e produção de partículas virais. A validação foi realizada a partir da expressão de marcadores de ciclo lítico, BZLF1 e gp350, enquanto a quantificação das partículas produzidas foi realizada a partir de curva-padrão com o genoma B95-8. A infecção de células epiteliais de nasofaringe foi avaliada a partir da estimativa do número de cópias do genoma viral. As células Akata-EBV+ contendo os genomas com comprometimento da expressão dos miR-BARTs 7 ou 9 apresentaram deficiência na produção de partículas virais quando comparadas as células contendo o genoma selvagem, enquanto na infecção de células epiteliais de nasofaringe, o comprometimento da expressão dos miR-BARTs 7 ou 9 influenciou positivamente, aumentando o número de cópias virais nas células infectadas com as versões editadas. Os dados apresentados demonstram estabelecimento de modelo experimental de estudo dos miR-BARTs do EBV, e indicam uma possível relação com eventos relacionados ao ciclo lítico do vírus.

---

**Abstract**

Epstein-Barr virus infection is associated with some types of cancers, such as Burkitt lymphoma (BL), and nasopharyngeal carcinoma (NPC). EBV is a ubiquitous virus, and infects, latently, the majority of adult population. The EBV latency is characterized by limited viral expression, expressing a few proteins and non-coding RNAs, such as miR-BARTs. The overexpression of EBV miR-BART 7 in NPC was associated with regulation of protein levels of PTEN suppressor gene. EBV miR-BART 9, on the other hand, regulates the expression of the LMP1 viral oncoprotein and the cellular E-cadherin. The regulation of these proteins suggests a role of miR-BARTs 7 and 9 in epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is important for progression of epithelial cancers. This study aims to create an experimental model to verify the role played by miR-BART7 and miR-BART9 in acquisition of features favorable to carcinogenesis. The model established is based on immortalized nasopharynx epithelial cells infected with wild type or edited viral particles for these miRNAs. The construction of this model employs the CRISPR/Cas9 technology for the EBV genome editing in Akata-EBV+ cells. The EBV+ Akata cells with wild type or mutated genome were chemically treated to activate lytic cycle and viral particles production. The validation was performed evaluating the expression of lytic cycle markers, BZLF1 and gp350, while the quantification of the produced particles was performed using a B95-8 genome standard curve. The nasopharynx epithelial cells infection was evaluated from the estimate of the viral genome copy number. The Akata-EBV+ cells containing genomes with impaired expression of miR-BARTs 7 or 9 showed deficiency in the production of viral particles when compared to cells containing the wild type genome, while in nasopharynx epithelial cells infection, the impairment of expression of miR-BARTs 7 or 9 positively influenced, increasing the viral copy number in cells infected with the edited versions. The data presented demonstrate the establishment of an experimental model for the study of EBV miR-BARTs, and indicate a possible relationship with events related to the lytic cycle of the virus.

---

## 1 Introdução

O termo “câncer” remete a um conjunto de doenças de natureza neoplásica que apresentam algumas propriedades compartilhadas, tais como instabilidade genômica, proliferação exacerbada, potencial replicativo indefinido, resistência a morte celular, entre outras (Hanahan e Weinberg 2011). Os cânceres possuem múltiplas apresentações possíveis, dependendo do sítio primário da doença local e célula de origem do tumor, por exemplo.

Estima-se que 19,3 milhões de novos casos de cânceres e 10 milhões de mortes associadas a essas doenças ocorreram em todo mundo em 2020 (Sung et al. 2021). A distribuição de casos e mortes por câncer varia de acordo com vários fatores, incluindo região geográfica, etnia e estilo de vida (Plummer et al. 2016). Para o ano de 2018, foram estimados 18,1 milhões de novos casos (Bray et al. 2018), sendo que 2,2 milhões (15,4%) foram associados a infecções (de Martel et al. 2020). Até o momento, são agentes infecciosos virais com potencial oncogênico para células humanas o vírus da hepatite C (*hepatitis C virus* – HCV), o vírus linfotrópico de células T humana tipo I (*human T lymphotropic virus* – HTLV-1), o vírus da hepatite B (*hepatitis B virus* – HBV), o poliomavírus de células de Merkel (*Merkel cell polyomavirus* – MCPV), o papilomavírus humano (*human papillomavirus* – HPV), o vírus humano sarcoma de Kaposi (*Kaposi's sarcoma human virus* – KSHV), e o vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus* – EBV) (IARC Working Group 2012).

Estudos seminais sobre a associação entre agentes infecciosos e o desenvolvimento de neoplasias em humanos remetem ao início do século XX. Em um trabalho publicado em 1911, Peyton Rous propôs que um agente filtrável, e não células transplantadas, seria responsável pelo desenvolvimento de sarcomas em frangos previamente saudáveis após a inoculação de filtrado acelular obtido da maceração do tecido neoplásico de aves doentes (Rous 1911). Em humanos, o primeiro vírus relacionado ao desenvolvimento de um câncer foi descrito em 1964 por Anthony Epstein e Yvonne Barr, que detectaram a presença de um novo herpesvírus em células derivadas de linfoma de Burkitt (*Burkitt Lymphoma* - BL), subsequentemente denominado EBV (Epstein, Achong, e Barr 1964). Atualmente está bem documentada a participação do EBV na etiopatogênese de diversos cânceres humanos, o que será detalhado a seguir.

---

## 1.1 Cânceres associados ao EBV

Formalmente denominado gama herpesvírus humano 4 (*Human gammaherpesvirus 4* - HHV-4), a infecção pelo EBV está associada ao desenvolvimento de doenças não-neoplásicas, como a mononucleose infecciosa e, mais recentemente, a esclerose múltipla (Bjornevik et al. 2022), além de diversas neoplasias malignas, sendo fortemente relacionado ao desenvolvimento do BL e do carcinoma de nasofaringe (*Nasopharyngeal Carcinoma* - NPC), mas também de parcela de casos de outros cânceres, incluindo a forma clássica do linfoma de Hodgkin (*Hodgkin Lymphoma* – HL), linfomas não-Hodgkin (notadamente em indivíduos imunocomprometidos) e adenocarcinomas gástricos (Kutok e Wang 2006; Tsao et al. 2015).

O BL pode ser classificado em forma endêmica, esporádica e o BL que acomete pacientes portadores de HIV (*Human immunodeficiency virus* – HIV), sendo que todas compartilham fundamentalmente os mesmos aspectos histopatológicos. O BL endêmico ocorre principalmente na África Equatorial e está associada ao EBV em 100% dos casos. A forma esporádica do BL é menos frequente e tem associação heterogênea com o EBV: 15-30% dos casos tem infecção pelo EBV na Europa e Estados Unidos, enquanto a região Nordeste do Brasil apresenta taxas que podem alcançar 80% (Shannon-Lowe, Rickinson, e Bell 2017).

Apesar de não apresentar elevada incidência mundial, o NPC é endêmico em regiões do Sudeste Asiático e Norte da África (Kutok e Wang 2006; Chen et al. 2019). Três formas histopatológicas do NPC são descritas: o NPC queratinizante, o NPC não-queratinizante (que pode ser diferenciado ou indiferenciado) e o NPC basaloide escamoso. O NPC não-queratinizante é o mais fortemente associado ao EBV, com virtualmente 100% dos casos relacionados à infecção viral em sua forma indiferenciada. Além da infecção pelo EBV, também contribuem no risco para o desenvolvimento desse câncer a exposição a nitrosamidas presentes na dieta e fatores genéticos, incluindo a constituição haplotípica de genes do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC) de classe I. A propósito, estudos na população Chinesa relataram que os haplótipos HLA-A\*02:07, A\*33:03 e B\*38:02 estiveram associados a maior susceptibilidade ao desenvolvimento do NPC, ao passo que foram associados com menor risco os haplótipos HLA-A\*11:01, A\*31:01, B\*13:01 e B\*55:02. (Tsao, Tsang, e Lo 2017).

---



Conhecer a estrutura e ciclo biológico do EBV é imprescindível para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das doenças associadas a infecção viral. Assim, informações básicas a respeito serão apresentadas a seguir.

## 1.2 Vírus de Epstein-Barr

A infecção primária por EBV costuma ocorrer nos primeiros anos de vida do indivíduo e tende a apresentar sintomas inespecíficos, equivalentes aos de outros quadros de infecção viral aguda. Entretanto, situações de exposição primária tardia ao vírus (e.g., a partir da adolescência) tendem a se manifestar com mononucleose infecciosa. Após a infecção primária, o EBV mantém uma infecção viral latente e assintomática que persiste durante toda a vida do indivíduo. Estima-se que aproximadamente 95% da população mundial adulta está infectada com EBV, mas em apenas uma pequena fração desses casos a infecção viral tende a se associar ao desenvolvimento de cânceres (Kutok e Wang 2006; Young, Yap, e Murray 2016)

A partícula viral do EBV é composta por um capsídeo icosaédrico em meio a proteínas tegumentares e envolto por envelope lipídico contendo glicoproteínas celulares e virais. Seu genoma é constituído de fita dupla de DNA com aproximadamente 180 kb, codificando mais de 90 produtos virais. O vírus tem tropismo por diversos tipos de célula, mas principalmente linfócitos B e células epiteliais. Na infecção do hospedeiro o EBV inicialmente tem contato com as células epiteliais da orofaringe. A glicoproteína gp350 expressa no envelope viral é capaz de associar-se com a porção Fab de anticorpos IgA em forma polimérica ligados entre si por meio de seu domínio J. O complexo dado pela gp350 do EBV e a IgA liga-se a uma proteína transmembrana, (*secretory component* – SC) presente em células epiteliais da nasofaringe, induzindo a entrada do EBV nas células epiteliais por endocitose (Sixbey e Yao 1992). Na célula epitelial infectada o EBV pode se replicar e liberar novas partículas virais para infectar outras células, tais como os linfócitos B (Longnecker, Kieff, e Cohen 2013), cuja infecção é mediada pela ligação da gp350 viral e o receptor 2 para fragmento do complemento (*Complement Receptor 2* – CR2), também denominado CD21, presente na membrana no linfócito B (Chandran e Hutt-Fletcher 2007). A infecção de linfócitos B tipicamente cursa com mudança do DNA viral para forma episomal e estabelecimento de infecção persistente da célula, estado denominado de latência viral.

De modo equivalente ao observado para outros herpesvírus, o ciclo biológico do EBV apresenta duas fases, denominadas de ciclos lítico e latente de infecção. Na infecção lítica há expressão de proteínas virais que estimulam a replicação do genoma viral e a síntese das

---

proteínas estruturais, culminando em geração de novas partículas virais e efeitos citopáticos na célula infectada. Durante a latência, o DNA viral é replicado durante a fase S do ciclo celular, com consequente segregação para as células-filhas, mecanismo que permite a permanência do EBV por tempo indeterminado no organismo (Hau e Tsao 2017). Esse é um importante mecanismo para escape do vírus das respostas do sistema imunitário do hospedeiro, posto que durante o ciclo latente a expressão de genes virais e a replicação viral são limitadas, restringindo estímulos potencialmente imunogênicos. A reativação do ciclo lítico viral ocorre sob condições mais favoráveis para a replicação viral, identificadas essencialmente pelo estado de ativação celular, e sinalização oferecida pelo microambiente, como ativação do receptor de célula B (*B cell receptor* – BCR), estresse oxidativo ou hipóxia (Li et al. 2016).

Dentre os produtos virais expressos durante o ciclo latente, podem ser identificados antígenos nucleares do EBV (*EBV encoded nuclear antigens* – EBNA), proteínas latentes de membrana (*latent membrane proteins* – LMPs), os pequenos RNAs codificados pelo EBV (*EBV encoded small RNA* – EBERs), além de miRNAs das regiões BHRF1 (*BamHI fragment H rightward open reading frame 1*) e BART (*BamHI-A region rightward transcript*) (Kang e Kieff 2015). De acordo com o repertório de produtos expressos durante a latência do EBV, quatro programas principais são convencionalmente descritos, denominados de latências tipo 0, I, II e III (Quadro 1).

**Quadro 1:** Programas de latência do EBV, definidos de acordo com os principais produtos virais expressos (Heslop 2009; Kang e Kieff 2015; Thorley-Lawson e Gross 2004)

<b>Programa</b>	<b>Principais produtos virais expressos</b>
Tipo 0 (Latência)	Não há expressão de produtos virais
Tipo I (EBNA-restrito)	EBERs, EBNA-1, miR-BARTs
Tipo II (Padrão)	EBERs, EBNAs 1 e 2, LMPs 1, 2A e 2B, miR-BARTs
Tipo III (Crescimento)	EBERs, EBNAs (1, 2, 3, LP), LMPs (1, 2A, 2B), miR-BARTs

Abreviações: EBNA - antígenos nucleares do EBV (*EBV encoded nuclear antigen*), LMP - proteína latente de membrana (*Latent Membrane Protein*), EBERs - pequenos RNAs codificados pelo EBV (*EBV-encoded small RNA*), miR-BART (*BamHI-A region rightward transcript*)

A infecção do EBV acompanha a via normal de ativação de linfócitos B. O modelo do centro germinativo é utilizado para explicar a trajetória do vírus no organismo, desde a infecção por EBV, passando por proliferação e diferenciação até a persistência (Thorley-Lawson 2015). Cada programa pode ser observado em diferentes tipos de células ou doenças. Por exemplo, o programa de latência tipo III é observado em linfócitos B *naïve* (exceto

linfócitos atípicos da mononucleose infecciosa), nos da doença linfoproliferativa pós-transplantes e em linhagens celulares linfoblastoides; o tipo II é observado em linfócitos B de centro germinativo e em células neoplásicas de NPC e do HL; já o programa de latência tipo I é observado em linfócitos B de memória e em células neoplásicas do BL (Kang e Kieff 2015; Ok, Li, e Young 2015; Heslop 2009).

Diversos produtos virais sintetizados durante a latência viral foram descritos com participação na carcinogênese induzida pelo vírus. Por exemplo, EBNA2 induz a ativação de diversos genes virais e celulares, culminando em proliferação celular. Outro exemplo é a proteína LMP1, que possui atividade similar à do receptor CD40, proporcionando ativação de sinalização intracelular por vias como NF- $\kappa$ B (principalmente) e MAPK (M.-S. Kang e Kieff 2015). Adicionalmente, foi observado que a expressão de LMP1 em células de NPC está relacionada a ativação do programa de transições epitelial-mesenquimal (*Epithelial-Mesenchymal Transitions* – EMTs), o que contribui para a progressão de carcinomas por facilitação de fenômenos como a migração e a invasão celular (Elgui de Oliveira, Müller-Coan, e Pagano 2016).

Além de proteínas virais, o EBV também expressa transcritos que não codificam proteínas (*non-coding RNAs* – ncRNAs), tais como os EBERs e miRNAs codificados nas regiões BHRF1 e BART de seu genoma. Os ncRNAs de EBV são expressos durante o ciclo latente e são importantes para a persistência viral por diferentes mecanismos, tais como inibição da apoptose e subversão da resposta do sistema imunitário do hospedeiro (Grey 2015). Sua ação também interfere na homeostase celular, de modo que podem contribuir no desenvolvimento neoplásico (Caetano et al. 2021). São diversos os processos celulares regulados por ncRNAs do EBV, incluindo miRNAs virais. Algumas das possíveis contribuições de miRNAs do EBV na carcinogênese associada à infecção viral são apresentadas na próxima seção.

### 1.3 microRNAs e carcinogênese

Os ncRNAs são transcritos que tipicamente não são traduzidos, mesmo quando suas sequências codificadoras estão ativamente expressas nas células. A classe mais estudada de ncRNA é a de RNAs pequenos não codificantes, ou microRNAs (miRNAs ou miRs), que tipicamente atuam como reguladores negativos da expressão gênica por interferirem na atividade de RNA mensageiros (*messenger RNA* - mRNA) aos quais são dirigidos (Shukla, Singh, e Barik 2012).

---

Um miRNA pode regular diversos genes e um mesmo gene pode ser regulado por diversos miRNAs. Grande parte dos miRNAs são transcritos a partir de regiões intrônicas e intergênicas. Esses transcritos primários (pri-miRNA) são processados pela enzima RNase III Drosha em conjunto com uma proteína ligante de RNA de fita dupla, DGCR8, e apresentam aproximadamente 70 pares de base. Esse processamento elimina parte das extremidades 5' e 3' do pri-miRNA, gerando o miRNA precursor (pre-miRNA), que é exportado do núcleo para o citoplasma pelo complexo exportina-5 e Ran-GTP. A maturação do pre-miRNA é realizada pela enzima Dicer e o complexo ribonucleoproteico de silenciamento induzido por miRNA (*miRNA-Induced Silencing Complex* – RISC) (Shukla, Singh, e Barik 2012). A complementaridade entre o miRNA e mRNA alvo é possível devido a presença de uma sequência de 8 nucleotídeos (*seed*) na região 5' do miRNA maduro. Após a identificação da sequência alvo no mRNA pelo miRNA, o mRNA pode ser imediatamente degradado ou ser direcionado para estruturas citoplasmáticas (corpos de processamento), nas quais ocorrerá sua degradação (O'Brien et al. 2018).

A regulação da expressão gênica por miRNAs abrange diversos fenômenos celulares, incluindo a proliferação e morte celular. Alterações na expressão de miRNAs podem causar desregulação desses processos e contribuir para o desenvolvimento tumoral. A expressão aberrante de miRNAs já foi descrita em diversos tipos de câncer, sugerindo que miRNAs possam apresentar atividade similar a oncogenes ou genes supressores tumorais. As alterações na expressão de miRNAs podem ocorrer, por exemplo, por anomalias cromossômicas, tais como deleção ou amplificação do locus que contém a sequência do pri-miRNA, ou por alteração da transcrição do pri-miRNA, propiciando aumento ou diminuição da expressão do(s) miRNA(s) correspondente(s) (Peng e Croce 2016).

Em cânceres humanos já foram descritos mecanismos de comprometimento de diferentes miRNAs, tais como os do grupamento (*cluster*) que contém os miRs-16-1/15a, que atuam na repressão da expressão da proteína antiapoptótica bcl-2. A deleção ou perda de heterozigose de miR-16-1/15a foi descrita em doenças hematológicas, e a restauração exógena desses miRNAs ocasionou indução de apoptose em células leucêmicas (Cimmino et al. 2005). Também é descrita a amplificação de locus gênicos que contém sequências que codificam miRNAs. Esse é o caso de miR-21, que é amplificado em glioblastomas e em consequência apresenta expressão elevada nesses tumores. A hiperexpressão de miR-21 compromete a apoptose e sua inibição parcial (*knock-down* – KD) em células de glioblastoma

---

proporcionou aumento desse tipo de morte celular, um efeito sugestivo de que a atividade desse miRNA é semelhante à de oncogenes (Chan, Krichevsky, e Kosik 2005).

Cânceres associados ao EBV também apresentam alterações na expressão de miRNAs. Por exemplo, foi relatada baixa expressão do miR-34c-5p em amostras de NPC e em linhagem derivada de NPC (HK-1, RRID: CVCL\_7084), quando comparado com tecido não neoplásico; o inverso foi observado para *NOTCH1*, que apresentou expressão elevada em NPC e diminuída nos tecidos não neoplásicos. A superexpressão induzida de miR-34c-5p em células HK-1 causou aumento de proteínas pró-apoptóticas, caspase-3, caspase9 e Bax, e diminuição de expressão de *NOTCH1* e de proteínas relacionadas a EMT, como caderina-N e vimentina, também foi observado diminuição das taxas de migração e invasão, indicando que os efeitos observados foram mediados pela inibição de *NOTCH1* pelo miR-34c-5p (Xu et al. 2020).

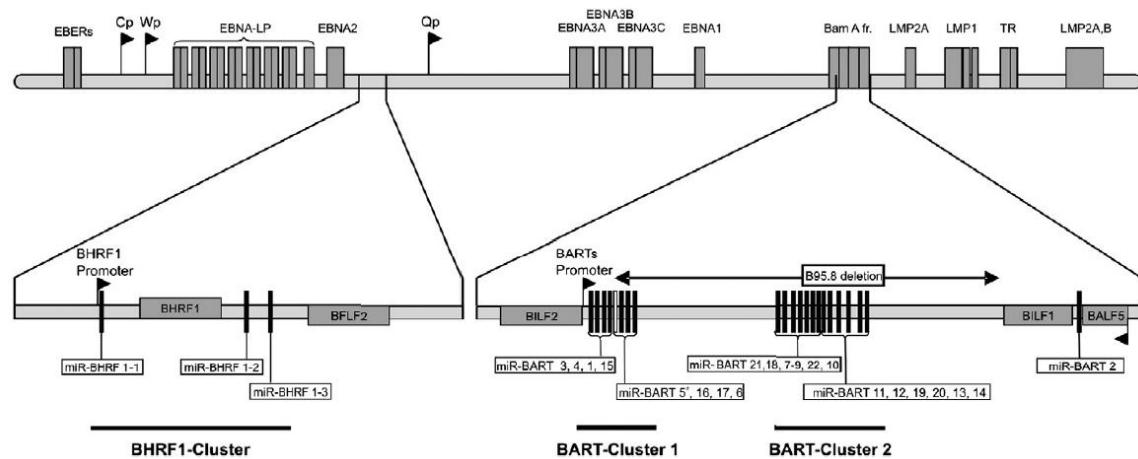
Pelo exposto, percebe-se que miRNAs regulam diversos processos celulares e que podem contribuir na patogênese de cânceres pela ação que exercem na homeostasia tecidual (Lee e Dutta 2009). Além dos miRNAs endógenos, mais recentemente tem sido relatado que miRNAs codificados no genoma de vírus também podem exercer papel importante em processos patológicos (Grey 2015). Embora diversas famílias de vírus têm miRNAs codificados em seu genoma, a maioria dos miRNAs virais conhecidos até o momento são oriundos de herpesvírus (Grundhoff e Sullivan 2011), sendo que os primeiros miRNAs virais foram identificados em 2004 no genoma do EBV (Pfeffer 2004).

A participação de miRNAs virais na carcinogênese ainda é pouco explorada, mas pode oferecer dados relevantes para elucidar os mecanismos de carcinogênese viral. Em particular, o entendimento da atividade de miRNAs codificados pelo EBV pode contribuir para melhor compreensão da patogênese dos diversos cânceres humanos associados à infecção por esse vírus.

#### **1.4 EBV, miRNA e carcinogênese**

Os *loci* gênicos BHRF1 e BART do EBV contém sequências que codificam 25 miRNAs precursores, dos quais se originam 44 miRNAs maduros (Figura 1). Quatro miRNAs precursores do EBV têm origem no locus BHRF1, enquanto 21 se originam de BART (Barth, Meister, e Grässer 2011). A predição de alvos para os miRNAs do EBV revelou genes celulares relevantes em diferentes processos celulares, incluindo a regulação da transcrição gênica, ciclo celular, apoptose, e a regulação de componentes de vias de sinalização intracelular (Pfeffer 2004).

---



**Figura 1:** Representação do genoma do EBV com destaque para as regiões BHRF1 e BART (*clusters* 1 e 2), onde são codificados a maioria dos miRNAs virais. Reproduzido de Barth et al. 2011 (Barth, Meister, e Grässer 2011).

Diferentes genótipos do EBV podem apresentar variações na expressão dos miRNAs virais (Tsai et al. 2017). Digno de nota, o genótipo viral B95-8 possui uma deleção genômica de aproximadamente 11 kb, que compromete parte da região BART e restringe a expressão de miR-BARTs (Figura 1) (Barth, Meister, e Grässer 2011). Uma vez que EBV B95-8 é capaz de transformar linfócitos B (Robertson, Tomkinson, e Kieff 1994), assume-se que a região BART não é essencial para transformação dessas células. Por outro lado, a inoculação de células epiteliais AGS-BX1 (derivadas de adenocarcinoma gástrico; RRID: CVCL\_0139) com expressão ectópica de miR-BARTs na nasofaringe de camundongos potencializou o desenvolvimento de tumores e sua agressividade biológica, comparativamente às células sem expressão dos miR-BARTs. Nesse estudo, todos os animais inoculados com células expressando os miR-BARTs desenvolveram tumores, desfecho que foi observado para metade dos animais do grupo controle (Qiu et al. 2015). Assim, ao menos no que se refere a cânceres de origem epitelial associados ao EBV, a expressão de miR-BARTs pode contribuir na tumorigênese *in vivo*.

Na perspectiva de que os miR-BARTs do EBV podem regular diversos processos biológicos relevantes na carcinogênese, observou-se que a superexpressão de miR-BART 11 proporcionou proliferação em células epiteliais HK-1, derivada de NPC, e AGS (RRID: CVCL\_0139), derivada de adenocarcinoma gástrico EBV-negativo (Song et al. 2016). Por outro lado, a expressão dos miR-BARTs -3, -6, -8, -16, e -22 em células AGS ocasionou redução em nível transcricional e proteico de produtos celulares com ação pró-apoptótica,

resultado corroborado pela ação de miméticos desses miR-BARTs (Kang, Skalsky, e Cullen 2015).

Os miRNAs virais podem também contribuir para evasão de respostas imunitárias do hospedeiro por diversas formas, incluindo alteração da expressão de citocinas e da interação dessas moléculas a seus receptores. Por exemplo, os miR-BARTs 1 e 2 do EBV tem como alvo o gene *IL12B*, que codifica uma subunidade da IL-12, citocina que estimula a polarização de linfócitos TCD4<sup>+</sup> para perfil Th1. A diminuição da síntese dessa subunidade prejudica a ação de IL-12, com reflexos na diferenciação de linfócitos Th1 e prejuízo da resposta imunitária citotóxica, importante contra a infecção viral (Tagawa et al. 2016). A análise do perfil de expressão de miRNAs do EBV em amostras de NPC revelou expressão elevada de miR-BARTs, incluindo miR-BART 1, ao passo que diversos miRNAs endógenos humanos tiveram sua expressão reduzida comparativamente a amostras de epitélio nasofaríngeo não-neoplásico (Cai et al. 2015).

Também há dados sobre participação de miR-BARTs do EBV em fenômenos importantes na progressão tumoral e disseminação de células malignas por metástase. Por exemplo, a superexpressão de miR-BART1 em células 5-8F (RRID: CVCL\_C528) e CNE-1 (RRID: CVCL\_6888) (ambas originalmente consideradas NPC, mas derivadas de linhagem HeLa) proporcionou elevação da capacidade migratória e de invasão *in vitro*, além de diminuição na expressão de caderina E e aumento de caderina N (Cai et al. 2015). Em outro estudo, foi notada elevada expressão de miR-BART 8-3p em amostras de NPC e a expressão ectópica desse miRNA viral promoveu aumento das taxas de migração e invasão *in vitro* para células das linhagens SUNE-1 (RRID: CVCL\_6946) (também derivada de HeLa) e CNE-1, além de estar associado com o desenvolvimento de metástases *in vivo*. De modo semelhante ao notado para miR-BART 1, a superexpressão de miR-BART 8-3p foi associada a uma diminuição de caderina E e aumento de caderina N, achados que sugerem ação dos miRNAs na regulação do programa de EMT (Lin et al. 2018).

É relatado que a superexpressão de miR-BART 7 ocasionou aumento da migração e invasão na linhagem de NPC HK-1, bem como nas células de linhagens derivadas de HeLa 5-8F, CNE-1 e HONE1 (RRID: CVCL\_8706) (Chan et al. 2012; Cai et al. 2015). Por outro lado, o silenciamento de miR-BART 7 suprimiu esses processos nas linhagens 5-8F e CNE-1 (Cai et al. 2015). Saliente-se que miR-BART 7 pode comprometer a atividade da proteína PTEN, que regula negativamente a via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ , indutora de EMT (Cai et al. 2015). No NPC, esse miRNA viral também foi relatado na regulação da expressão do peptídeo A relacionado ao MHC-I (*Major histocompatibility complex class I Chain-related*

---

*peptide A* - MICA), responsável pela ativação de células matadoras naturais (*Natural Killers* – NK), e sua expressão é regulada por TGFβ1/c-myc (Wong et al. 2018). Na linhagem HK-1 (NPC) foi observada diminuição da expressão de TGFβ1/c-myc/MICA quando transfectadas com miR-BART 7 sintético e houve redução da sensibilidade dessas células à ação citotóxica de células NK em co-cultura, sugerindo que miR-BART 7 contribui para evasão do sistema imunitário (Wong et al. 2018).

Em relação a miR-BART 9, foi reportado que sua expressão é limitada a células derivadas de NPC e sua expressão ectópica em células de NPC EBV-negativas das linhagens BM1 (RRID: CVCL\_6007), HK-1 e TW04 (RRID: CVCL\_6011) proporcionou aumento da capacidade migratória e de invasão *in vitro*, além de diminuição de caderina E, em níveis transcricional e proteico (Hsu et al. 2014). Ademais, miR-BART 9 foi encontrado superexpresso em linfoma de células T/NK nasais, e sua superexpressão em células SNK6 (RRID: CVCL\_A673) (derivadas desse tipo de linfoma), proporcionou elevação da proliferação celular, além de aumento na expressão de LMP1 – efeito revertido em nível transcricional e proteico pela inibição de miR-BART-9 (Ramakrishnan et al. 2011). Outra proteína regulada por miR-BART 9 é a proteína mutada na ataxia-telangectasia (*Ataxia Telangiectasia Mutated* - ATM), uma quinase envolvida no reparo de fita dupla de DNA: a expressão de ATM esteve inversamente relacionada a expressão de miR-BART 9-3p e miR-BART 7 -3p em amostras de NPC, que tipicamente apresentam expressão elevada dos miRNAs virais (Lung et al. 2018).

Pelo exposto, percebe-se que os dados disponíveis subsidiam a ideia de que alguns miR-BARTs do EBV, tais como os miR-BARTs 7 e 9, podem participar em processos relacionados a manutenção de latência viral e na carcinogênese induzida pelo vírus, eventualmente contribuindo na patogênese do NPC e de outros cânceres epiteliais associados à infecção viral. Como os dados a respeito ainda são escassos, este trabalho demonstra o estabelecimento de um modelo experimental com células imortalizadas de epitélio de nasofaringe para investigação da contribuição de miR-BARTs do EBV na aquisição de propriedades associadas a malignização.



## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

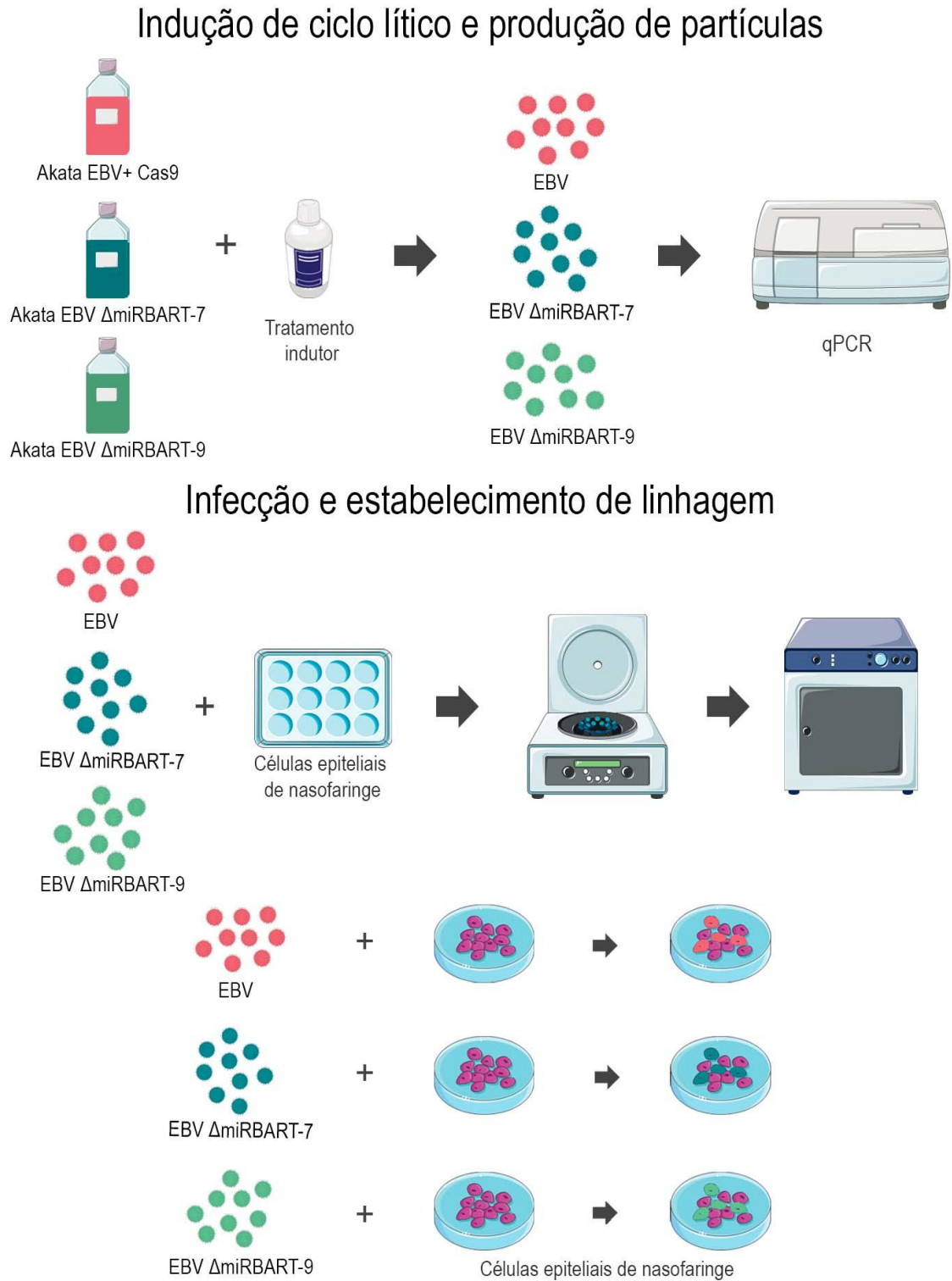
Este estudo visa estabelecer um modelo experimental baseado em células humanas imortalizadas de epitélio de nasofaringe para investigação de efeitos de miRNAs do EBV no fenótipo celular *in vitro*, de modo a contribuir para estudos que se proponham investigar a patogênese do carcinoma de nasofaringe associado à infecção viral.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Produzir partículas de EBV com comprometimento da expressão dos miR-BARTs 7 e 9 obtido por edição do genoma viral com tecnologia CRISPR/Cas9;
  2. Estabelecer protocolo de indução de ciclo lítico para produção de partículas virais com e sem edição dos miR-BARTs 7 e 9 do EBV;
  3. Estabelecer protocolo para infecção pelo EBV de células humanas imortalizadas de epitélio de nasofaringe.
-

### 3 Materiais e métodos

A Figura 2 resume o desenho experimental deste trabalho. Experimentos adicionais realizados durante o mestrado são apresentados no Material Suplementar do Apêndice.



**Figura 2:** Delineamento experimental, indicando o estabelecimento dos protocolos de produção de partículas virais e infecção de células epiteliais.

### 3.1 Linhagens celulares

A linhagem Akata-Cas9 (RRID: CVCL\_VN88), gerada pelo grupo liderado pelo Professor Benjamin Gewurz, da Faculdade de Medicina de Harvard, foi utilizada para edição do genoma do EBV e produção das partículas virais selvagens (*Wild Type* -WT) e geneticamente modificadas. Essa linhagem apresenta o genoma do EBV, um cassete de resistência ao antibiótico G418 (geneticina), um gene para expressão da proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein* - GFP) e uma sequência de cromossomo artificial bacteriano (*Bacterial Artificial Chromosome* - BAC) denominado TXneoV-BAC (Kanda et al. 2004), além de sequência para expressão da proteína Cas9 para edição genômica via tecnologia CRISPR/Cas9. Essas células foram transduzidas com gRNA para deleção do miR-BART 7 ou 9. A edição gênica com CRISPR/Cas9 e sua validação foram realizadas pelo doutorando Brunno Felipe Ramos Caetano, como parte de outro trabalho do grupo ViriCan (Caetano 2022).

Uma vez geradas as linhagens celulares contendo o genoma do EBV WT e genomas virais com comprometimento de miR-BART-7 (Akata-Cas9- $\Delta$ miR-BART-7sg2) ou miR-BART-9 (Akata-Cas9- $\Delta$ miR-BART-9sg2) (Caetano 2022), partículas virais do EBV foram geradas para infecção das linhagens derivadas de células humanas de epitélio nasofaríngeo NP460<sup>hTert</sup> (RRID: CVCL\_X205) – células imortalizadas pela expressão ectópica da unidade catalítica da telomerase humana (hTert) (Li et al. 2006), linhagem gerada pelo grupo liderado pelo Professor George Sai-Wah Tsao (Universidade de Hong Kong, China), doravante denominada NP460 – e NP69<sup>SV40T</sup> (RRID: CVCL\_F755) – células imortalizadas pela expressão da oncoproteína TAg (*Large T antigen*) do vírus símio 40 (*Simian virus 40* - SV40), doravante denominada NP69 (Tsao et al. 2002), linhagem estabelecida pelo grupo liderado pelo Professor George Sai-Wah Tsao (Universidade de Hong Kong, China), e gentilmente cedidas pela Dr. Ethel Cesarman (Universidade Cornell, NY, USA).

A linhagem Akata-Cas9 e suas derivadas foram cultivadas em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum* – FBS) e 0,4% de gentamicina para controle microbiológico, 500  $\mu$ g/mL de geneticina (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 10  $\mu$ g/mL de blasticidina (ThermoFisher) para manutenção da seleção do BAC contendo o genoma do EBV e da proteína Cas9, respectivamente. Células NP460 foram cultivadas empregando meio definido para crescimento de queratinócitos SFM (*Defined Keratinocyte-SFM* / DK-SFM) acrescido de suplemento fornecido pelo fabricante (*Defined Keratinocyte-SFM Growth Supplement*; 1mL para 500mL de meio) e meio EpiLife

---

(ThermoFisher). Para cultivo das células NP460, os meios completos DK-SFM e EpiLife foram misturados 1:1 e acrescidos de 2,5% de FBS e 0,4% de gentamicina. Para o cultivo da linhagem NP69 foi utilizado meio para queratinócitos (*Keratinocyte-SFM (IX)* – ThermoFisher) acrescido de fator de crescimento epidermal (*recombinant Epidermal Growth Factor – rEGF*) em concentração final de 25µg/mL e de extrato de pituitária bovina (*Bovine Pituitary Extract – BPE*) em concentração final de 0,2ng/mL, após adição dos suplementos, ainda foi acrescido 5% de FBS e 1% de gentamicina. Todas as linhagens foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% CO<sub>2</sub>.

As linhagens foram validadas quanto à autenticidade genética por meio de análise de repetições curtas em *tandem* (*Short tandem repeats – STRs*) utilizando o sistema comercial GenePrint 10 (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com instruções do fabricante. O perfil de STR para a linhagem NP69 foi compatível com o previamente descrito na literatura (Chan et al. 2008). Para NP460, o perfil foi validado a partir de informações cedidas pelo grupo de pesquisa liderado pelo Prof. George Sai-Wah Tsao (Universidade de Hong Kong, China), que generosamente cedeu a linhagem. Para a linhagem Akata-Cas9, o perfil foi validado com base nas informações disponíveis na plataforma *Cellosaurus* (<https://web.expasy.org/cellosaurus/>). Os perfis de STR obtidos para as linhagens mencionadas estão indicados no Quadro 2.

**Quadro 2:** Perfis de STR obtidos na autenticação das linhagens empregadas no estudo

- Akata-Cas9: AMEL: X, X; CSF1PO: 11; D5S818: 11, 12; D7S820: 10, 12; D13S317: 8, 12; D16S539: 10, 11; TH01: 9; TPOX: 8,11; vWA: 14,16
- NP460<sup>hTert</sup>: AMEL: X, Y, CSF1PO: 13, 14; D13S317: 9, 10; D16S539: 11, 12; D21S11: 29, 32.2; D5S818: 11, 12; D7S820: 10, 11; TH01: 7, 9.3; TPOX: 9, 11; vWA: 17, 19
- NP69<sup>SV40T</sup>: TH01: 7; D21S11: 31; D5S818: 11; D13S217: 10, 12; D7S820: 11; D16S539: 11, 12; CSF1PO: 12, 13; AMEL: X, Y; vWA: 16, 19; TPOX: 11

As células utilizadas nos experimentos foram também verificadas quanto a ausência de contaminação por micoplasma por meio de reação em cadeia de polimerase (*Polymerase chain reaction – PCR*) utilizando iniciadores previamente descritos (Uemori et al. 1992). Para a reação foram utilizados Tampão PCR 10x (100mM Tris-HCL, 500mM KCl, pH8,5), 50mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM dNTP, os iniciadores MCGP (S – ACACCATGGGAGCTGGTAAT; AS – CTTTCATCGACTTTCAGACCAAGGCAT), em concentração de 30µM, e 1U Taq DNA Polimerase convencional. A reação foi realizada

utilizando as condições 95°C – 3 min (1x); 94°C – 30s, 55°C – 30s, 72°C – 30s (35x); 72°C – 10 min (1x); 4°C - ∞.

### 3.2 Indução de ciclo lítico do EBV

A produção de partículas do EBV requer indução de ciclo lítico em células infectadas pelo vírus, o que foi realizado com base em instruções da literatura (Lan et al. 2007) empregando células Akata-Cas9 tratadas com 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e butirato de sódio (*Sodium Butyrate* - SB). Resumidamente,  $1 \times 10^7$  células foram centrifugadas a 244xg por 5 min em temperatura ambiente, lavadas com solução fosfato-salina modificada por Dulbecco (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* – DPBS) e novamente centrifugadas como previamente indicado. As células foram ressuspensas em 10mL de meio RPMI contendo concentrações finais de 10% de FBS, 20ng/mL de TPA e 3mM de SB. As células foram então incubadas para indução do ciclo lítico viral por 72h a 37°C em atmosfera úmida e 5% CO<sub>2</sub>, seguindo-se a coleta das células e de seu sobrenadante contendo as partículas do EBV produzidas. Sobrenadante e células foram separados por centrifugação (244xg por 5 min em temperatura ambiente), o sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado da cultura celular e filtrado com seringa acoplada a filtro (membrana com poros de 0,45µm). As células foram lavadas com DPBS, seguido de nova centrifugação (244xg por 5 min em temperatura ambiente) e retirada do DPBS, sobrenadante e células foram armazenados a -80°C até a realização dos tratamentos subsequentes.

A partir das células Akata-Cas9 submetidas a indução lítica do EBV foi efetuada extração de RNA com o reagente *TRIzol* (ThermoFisher). O RNA total obtido foi ressuspensado em 20 µL de água livre de RNases e quantificado no equipamento NanoDrop, as quantidades de material obtidas foram 1829 ng/µL, para a amostra sem indução de ciclo lítico e 157 ng/µL, para amostra com indução de ciclo lítico. Subsequentemente, o RNA foi tratado com DNase I (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) e submetido a síntese de cDNA com o sistema *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (ThermoFisher). O cDNA foi quantificado no equipamento NanoDrop, foram obtidos 291 ng/µL e 294 ng/µL para amostras sem indução e com indução de ciclo lítico, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes dos insumos de pesquisa empregados.

A produção de partículas do EBV no sobrenadante foi estimada a partir de DNA viral extraído do sobrenadante das células tratadas quimicamente (TPA+SB) para indução de ciclo lítico viral, baseado em protocolo previamente descrito (Feederle et al. 2009). Em síntese, o

sobrenadante foi tratado com DNase I (Sigma-Aldrich) na proporção 5U/50 $\mu$ L de sobrenadante a 37°C por 1h, seguido de inativação enzimática a 70°C por 10 min. O sobrenadante foi acrescido de tampão de lise (0.1 mg/mL de proteinase K em água) em proporção 1:1 (v/v) e incubado a 50°C por 1h, seguindo-se inativação enzimática a 75°C por 20 min. A eficiência do tratamento com DNase I foi avaliada por qPCR em termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) e AriaMx (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), empregando reagente *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega) e iniciadores dirigidos ao gene BGLF5 do EBV, utilizados em trabalho prévio do grupo (Ferraz da Silva et al. 2015). A Figura Suplementar 8 indica que o tratamento com DNase I foi efetivo na eliminação de cópias de DNA viral livre presentes no sobrenadante celular, mantendo-se esse protocolo nos experimentos subsequentes.

A estimativa de partículas virais foi efetuada por meio de qPCR. A análise da expressão de produtos de ciclo líticos do EBV nas células Akata-Cas9, por sua vez, foi realizada com iniciadores dirigidos aos transcritos virais BZLF1 e gp350 (Xu et al. 2012), além de iniciadores para o transcrito da proteína ribossomal 18S (*Ribosomal Protein S18 – RPS18*), componente da subunidade 40S do ribossomo e empregado como normalizador da expressão gênica. A expressão relativa foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Schmittgen e Livak 2008). Ambos os experimentos foram realizados com duplicatas técnicas; maiores detalhes sobre as condições experimentais são indicados no Quadro 3.

**Quadro 3:** Condições experimentais de qPCR para verificação de indução de ciclo lítico e quantificação de partículas virais.

Propósito experimental, alvos e iniciadores (5'-3')	Componentes da reação	Condições da reação
<b>Verificação da indução de ciclo lítico</b> <u>EBV gene BZLF1 (proteína ZEBRA)</u> S: TACAAGAATCGGGTGGCTTC AS: GCACATCTGCTTCAACAGAA <u>EBV gene BLLF1 (proteína gp350)</u> S: TGTTACAGTGACTGCCTTTTGGG AS: GGTGTCCCCGAGGTGAGAGT <u>Gene humano RPS18 (proteína 40S)</u> S: AGAAACGGCTACCACATCCA AS: CACCAGACTTGCCCTCCA	GoTaq qPCR Master Mix, 0,2µM de iniciadores, 200ng de cDNA, Água livre de nuclease q.s.p.	95°C – 2 min (1x); 95°C – 15s, 60°C – 60s, (40x)
<b>Quantificação de partículas virais</b> <u>EBV gene BGLF5 (proteína bglf5)</u> S: CCTCTTTTCCAAGTCAGAATTTGA AS: TGACCTCTTGCATGGCCTCT	GoTaq qPCR Master Mix, 0,2µM de iniciadores, 3µl de sobrenadante, Água livre de nuclease q.s.p.	50°C – 2 min (1x); 95°C – 15 min (1x); 95°C – 20s, 60°C – 60s (45x)

A quantificação das partículas virais se valeu de curva-padrão preparada com diluição seriada do genoma do EBV variante B95-8, disponível comercialmente (*Advanced Biotechnologies*, Columbia, MD, EUA). Foram utilizados 6 pontos cobrindo o faixa de 10ng até 0,1pg de genoma viral purificado. O cálculo do número de partículas virais foi estimado com auxílio da ferramenta *NEBioCalculator* (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/dsdnaamt>), que utiliza massa (em gramas) e tamanho (pb) do DNA genômico para estimar total de moles e número de cópias genômicas. Como referência, foi empregado o tamanho do genoma do EBV de código #NC\_007605.1 nas bases do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI) dos EUA. Uma vez estabelecido o número de cópias correspondente a cada ponto da curva-padrão, os valores de Ct obtidos na amplificação do DNA viral (DNase-resistente) nos sobrenadantes da cultura celular foram calculados a partir de equação gerada com os dados da curva-padrão com o genoma viral de referência (EBV B95-8).

A indução de ciclo lítico do EBV pode ser desencadeada a partir da ligação de anticorpos IgG ao seu receptor nas células infectadas (Takada 1984). Assim sendo, foi

avaliada a eficiência de produção de partículas virais após indução de ciclo lítico utilizando diferentes concentrações de anticorpos anti-IgG humano em células Akata-Cas9. Essa análise contou com células não-tratadas e células tratadas com TPA e SB (nas concentrações previamente indicadas) e o anticorpo anti-IgG (Fab) humano produzido em cabra (Sigma-Aldrich), nas concentrações 10, 20 e 30 $\mu$ g/mL, estabelecidas com base na literatura (Kraus et al. 2020). A indução foi realizada de acordo com o protocolo aqui descrito, ajustado de acordo com a quantidade de células utilizadas. Foram utilizadas 2x10<sup>6</sup> células Akata-Cas9 por condição, ressuspensas em 2mL de meio de cultura. A produção de partículas foi avaliada a partir da estratégia de quantificação descrita nesta seção, que utiliza DNA extraído de partículas virais para avaliação do alvo BGLF5 por qPCR, propiciando uma estimativa do número de cópias genômicas do EBV. O experimento foi realizado com duplicatas técnicas e as condições estão representadas no Quadro 3.

### 3.3 Infecção de linhagem celular derivada de epitélio de nasofaringe

Para criação de uma linhagem celular EBV-positiva derivada de epitélio de nasofaringe foi estabelecido procedimento baseado em protocolo de infecção gentilmente cedido pela Dra Suzane Ramos da Silva, pesquisadora da *International AIDS Vaccine Initiative* (IAVI), New York, NY, EUA.

Em síntese, foram inicialmente obtidas as partículas virais infectantes liberadas em sobrenadante de cultura de células Akata-Cas9 infectadas com o EBV. O sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado da cultura celular, filtrado com seringa acoplada a filtro (membrana com poros de 0,45 $\mu$ m), e armazenado a -80°C até uso oportuno. Para a infecção de células NP69 com as partículas do EBV, 2x10<sup>5</sup> células foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas por 24h para sedimentação e adesão. Para controle da quantidade de partículas utilizadas em cada condição, foi calculada a multiplicidade de infecção (MOI) – relação dada pelo número de partículas infectantes e número de células submetidas ao tratamento (Abedon e Bartom 2013). O sobrenadante utilizado neste experimento apresentou 6,9x10<sup>5</sup> partículas/ $\mu$ L, valor em que se baseou o cálculo do número de partículas de acordo com o volume de sobrenadante utilizado em cada condição experimental. O número obtido foi dividido pelo número de células, obtendo a MOI para cada condição. Assim a MOI para as condições 0,1; 1,0 e 10% foi de 3,5; 34,8 e 347,9, respectivamente. O protocolo de infecção teve início com a remoção do meio de cultura e lavagem da monocamada celular com solução DPBS. Subsequentemente, as células NP69 receberam meio de cultura contendo frações do sobrenadante contendo as partículas virais

---



(0,1, 1 e 10%) acrescidas de 12µg/mL de brometo de hexadimetrina (*Polybrene*, Sigma-Aldrich) e foram submetidas a centrifugação a 1.640xg por 60 min a 37 °C. O meio contendo as partículas virais foi retirado, efetuando-se novo ciclo de lavagem com DPBS e adição de meio de cultura acrescido do sobrenadante contendo as partículas virais e brometo de hexadimetrina, repetindo-se o procedimento até totalizar 4 vezes. Ao final o meio de cultura remanescente nas células foi substituído por novo meio para células NP69, que seguiram para incubação por 48h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub>. Esse protocolo foi utilizado em todas as infecções posteriores, estabelecendo-se o emprego de 10% (v/v) de sobrenadante com partículas virais livres (proveniente das células Akata-Cas9) em meio próprio de cada linhagem celular submetida à infecção *in vitro*.

A avaliação da infecção foi com DNA total extraído das células NP69 utilizando o sistema *Wizard SV Genomic DNA Purification* (Promega), o DNA foi eluído em 100 µL de água livre de nucleases e quantificado no equipamento NanoDrop, a concentração de cada amostra foi próxima a 100 ng/µL. O DNA obtido foi empregado para amplificação de segmento da região promotora do gene humano codificador de TNF-α contendo o SNP rs1800630, doravante denominado pTNF-α -862, além de segmento do gene BGLF5 do EBV, que codifica proteína DNase viral, expressa durante o ciclo lítico. As condições experimentais estão descritas no Quadro 4; as reações de qPCR foram executadas em volume total de 10µL com emprego do termociclador AriaMx (Agilent).

**Quadro 4:** Condições de qPCR para verificação de infecção e quantificação de partículas virais.

Alvo e iniciadores (5' – 3')	Componentes da reação	Condições de reação
<b>SNP humano rs1800630 (pTNF-α -862)</b> S: ATGTAGCGGCTCTGAGGAATGGGTTAC AS: CTACATGGCCCTGTCTTCGTTAAG	GoTaq qPCR Master Mix, 0,2µM de iniciadores, 90ng de DNA, Água livre de nucleases q.s.p.	94°C – 5 min (1x); 94°C – 20s, 58°C – 20s, 72°C – 20s (40x)
<b>EBV BGLF5 (proteína de ciclo lítico)</b> S: CCTCTTTTCCAAGTCAGAATTGA AS: TGACCTCTTGCATGGCCTCT	GoTaq qPCR Master Mix, 0,2µM de iniciadores, 90ng de DNA, Água livre de nucleases q.s.p.	50°C – 2 min (1x); 95°C – 15 min (1x); 95°C – 20s, 60°C – 60s (45x)

S. Iniciador sense; AS: Iniciador antisense.

Os efeitos da infecção por partículas de EBV com edições genômicas que comprometem nas sequências miR-BARTs 7 e 9 nas células NP69 foram estimados em termos de viabilidade celular empregando ensaio cromogênico de redução de sais de

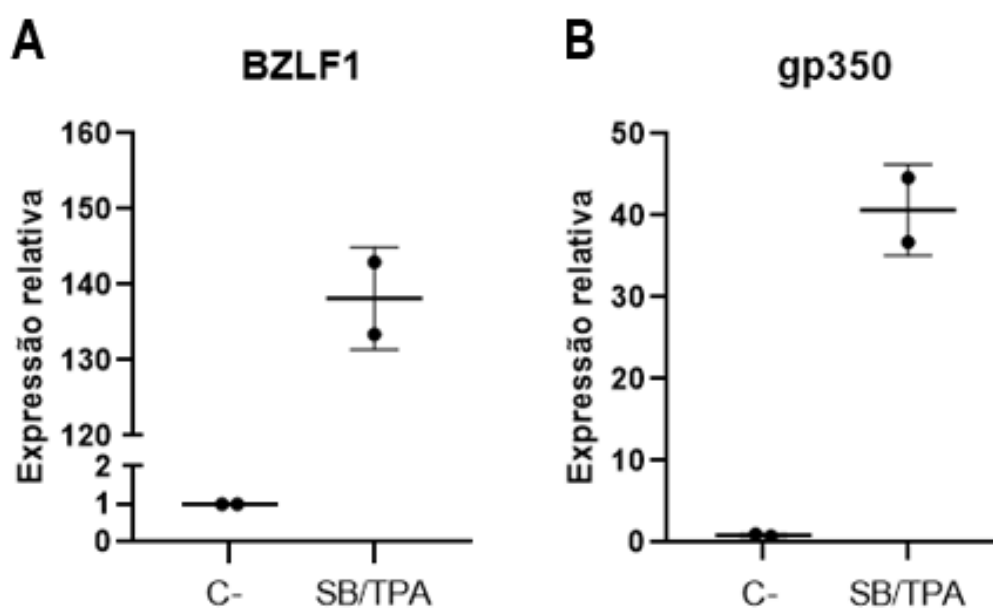
formazan com o reagente brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT; ThermoFisher). Resumidamente,  $2 \times 10^3$  células foram semeadas por poço em placa de 96 poços e cultivadas em seu meio de cultura completo por 24h, seguido por incubação com meio de cultura sem FBS por mais 24h para sincronização de ciclo celular; ambos os procedimentos foram realizados a 37 °C em atmosfera úmida e 5% CO<sub>2</sub>. Subsequentemente, foram acrescentados 10µL de MTT na concentração de 5mg/mL às células em cultivo, seguindo-se nova incubação por 4h, remoção do meio de cultura e adição de 200µL de DMSO anidro e incubação por 10 min. Em seguida procedeu-se leitura da reação a 570nm em espectrofotômetro Bio-Rad, modelo 680 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e cálculo da viabilidade celular baseada nos valores de absorbância obtidos.

---

## 4 Resultados

### 4.1 Indução de ciclo lítico e quantificação de partículas virais

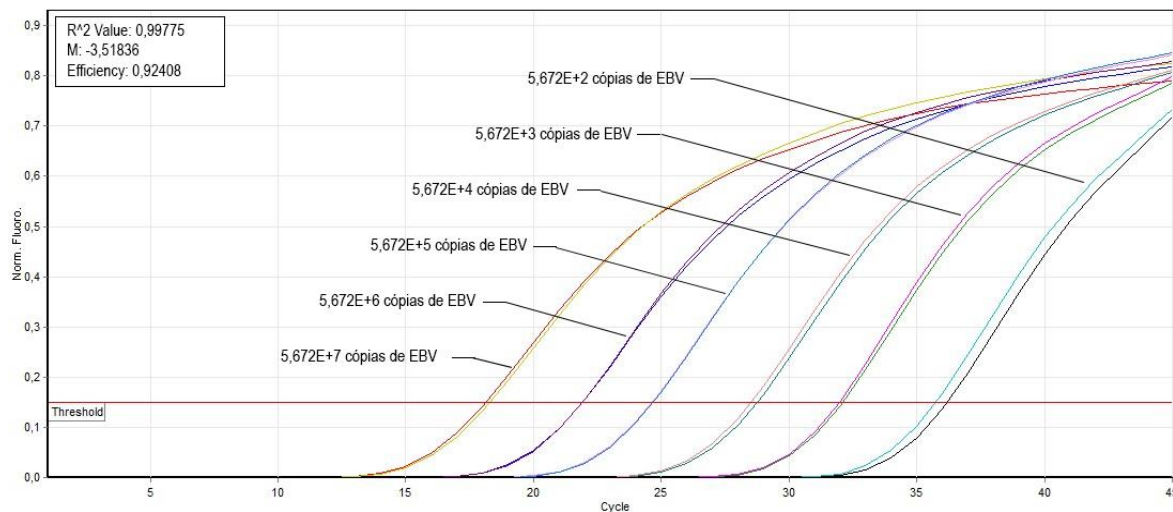
A indução de replicação lítica do EBV foi verificada pela análise de expressão de dois genes virais tipicamente expressos durante essa etapa do ciclo biológico viral: BZLF1, que codifica a proteína ZEBRA, uma proteína transativadora expressa no início do ciclo lítico; e BLLF1, que codifica a glicoproteína gp350, expresso mais tardiamente durante o ciclo lítico (Murata 2018). Conforme demonstrado na Figura 3, a indução química de ciclo lítico (TPA+SB) proporcionou aumento da expressão desses genes, indicando que a indução foi efetiva.



**Figura 3:** Análise por qPCR da expressão de genes de ciclo lítico do EBV em células Akata-Cas9 infectadas pelo vírus e tratadas com 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) 20ng/mL e butirato de sódio (SB) 3mM. (A) EBV BZLF1, que codifica o transcrito Zta, expresso precocemente durante o ciclo lítico viral; (B) EBV BLLF1, que codifica gp350, expresso tardiamente no ciclo lítico. Expressão relativa em relação ao controle negativo (C-), que corresponde a células sem indução de ciclo lítico (i.e., não-tratadas com os compostos químicos indicados).

A Figura 4 apresenta a curva-padrão gerada para estimativa da quantidade de partículas virais após indução de ciclo lítico; os dados correspondentes estão no Quadro 5. A estimativa de quantidade de partículas virais foi realizada utilizando o valor médio de Ct obtido para expressão do gene viral BGLF5 (21,46) e aplicado na equação da regressão linear indicada na Figura 5 para se determinar o valor correspondente em termos de massa genômica. O número aproximado de partículas virais foi calculado com o auxílio da ferramenta online

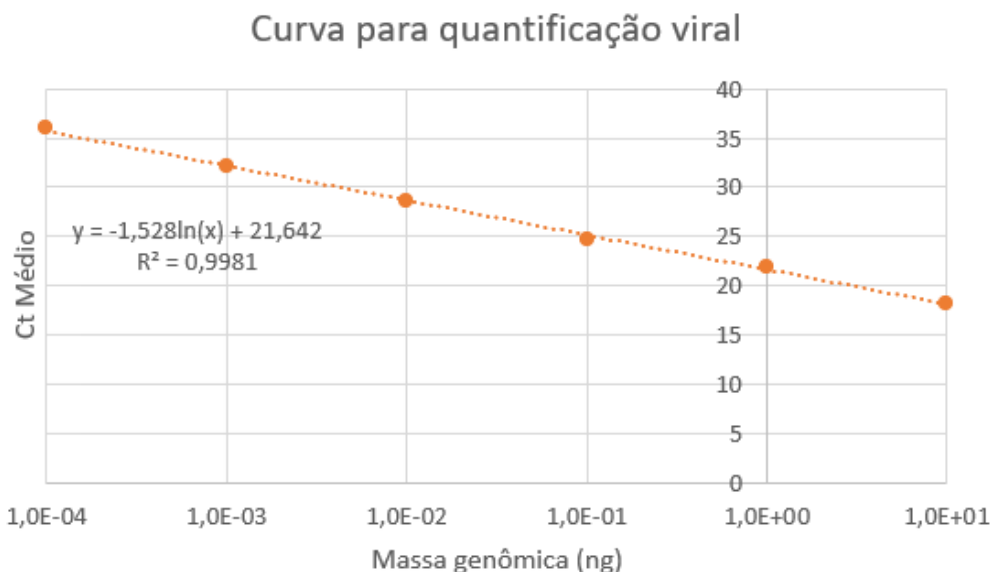
NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/>), obtendo-se a estimativa de  $6,352 \times 10^6$  partículas virais por  $\mu\text{L}$  de reação.



**Figura 4:** Curva de amplificação linear do gene BGLF5 do EBV por qPCR, evidenciando o número de cópias de genoma viral correspondente às diferentes quantidades de vetor (genoma da variante B95-8 do EBV - Advanced Biotechnologies) utilizadas.

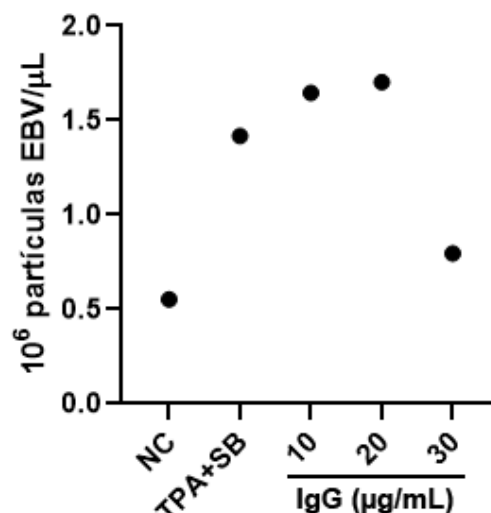
**Quadro 5:** Correspondência entre massa genômica viral (ng), valor de Ct obtido para o gene BGLF5 do EBV (qPCR) e número de cópias do genoma viral calculado para cada ponto da curva-padrão para estimativa de número de partículas virais nos experimentos de indução de replicação lítica.

Massa (ng)	Média Ct	Número de cópias
$10^1$	18,23	$5,672 \times 10^7$
$10^0$	21,92	$5,672 \times 10^6$
$10^{-1}$	24,68	$5,672 \times 10^5$
$10^{-2}$	28,65	$5,672 \times 10^4$
$10^{-3}$	32,05	$5,672 \times 10^3$
$10^{-4}$	35,99	$5,672 \times 10^2$



**Figura 5:** Relação entre massa genômica (ng) e ciclo limiar médio (Ct) gerada com base em resultados de amplificação do gene BGLF5 do EBV por qPCR empregando diluições seriadas de DNA genômico do genótipo viral B95-8. A equação indicada foi empregada para cálculo da quantidade de partículas virais obtidas nos experimentos de indução de replicação lítica viral.

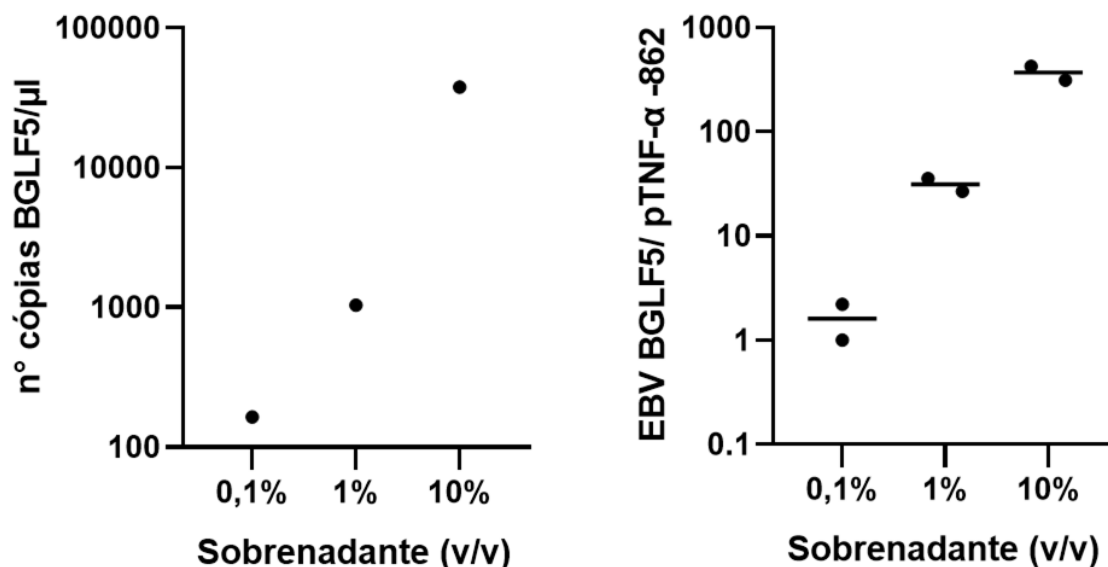
A fim de se estabelecer a melhor estratégia de produção de partículas virais, foi realizado experimento de indução de ciclo lítico do EBV com diferentes concentrações de anticorpo anti-IgG humano, além do tratamento químico previamente indicado (TPA+SB). O número de partículas virais foi estimado conforme descrito previamente nesta seção. Conforme observado na Figura 6, houve elevação do número de partículas em relação a células não-tratadas tanto para o tratamento com TPA+SB e como para indução com anticorpo anti-IgG (Fab) humano nas concentrações de 10 e 20 $\mu$ g/mL. Entretanto, não foi percebida diferença substancial entre o tratamento químico e a indução com anti-IgG, razão pela qual optou-se por efetuar os próximos experimentos com a indução com TPA+SB.



**Figura 6:** Estimativa do número de partículas do EBV (baseada em resultados de amplificação do gene viral BGLF5 por qPCR) no sobrenadante de células Akata-Cas9 infectadas e tratadas para indução de ciclo lítico com 20ng/mL de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) + 3mM de butirato de sódio (SB), ou com anticorpo anti-IgG (Fab) humana nas concentrações de 10, 20 ou 30μg/mL. Dados normalizados com base no n° de partículas/μL de sobrenadante em amostra sem tratamento com DNase e proteinase K. Resultados de um único experimento.

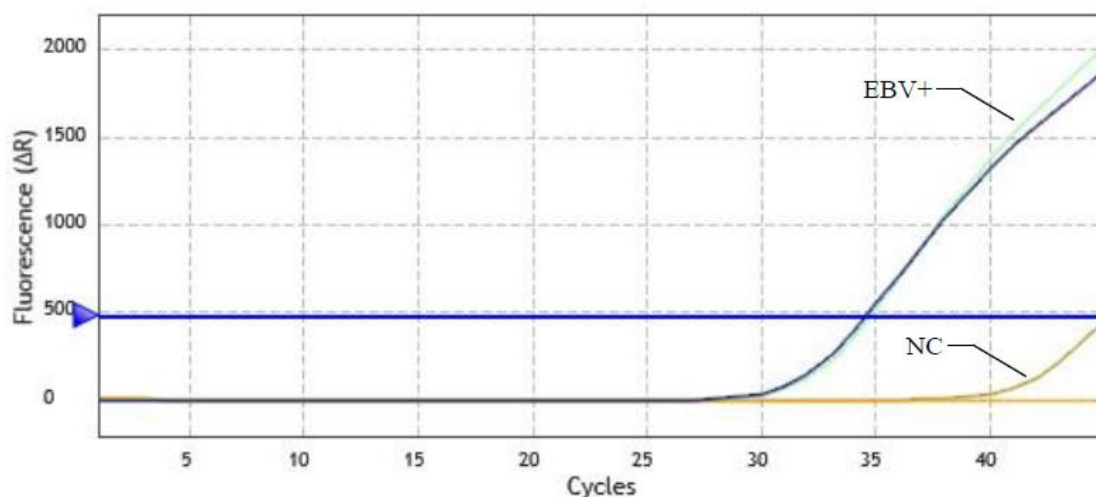
#### 4.2 Efeitos da infecção pelo EBV em células NP69<sup>SV40T</sup>

Células NP69 foram infectadas com diferentes quantidades de partículas virais do EBV, obtidas com o emprego de diferentes volumes (0,1%; 1,0% e 10% v/v) de sobrenadante de cultura de células Akata-Cas9 EBV-positivas submetidas a indução química de ciclo lítico, conforme previamente descrito. A análise dos resultados da infecção (estimada por amplificação de segmento do gene BGLF5 do EBV qPCR a partir de DNA total extraído das células submetidas ao protocolo de infecção) revelou maior eficiência quando empregado 10% do volume de sobrenadante contendo partículas virais (Figura 7).



**Figura 7:** Estimativa da eficiência de infecção pelo EBV de células NP69<sup>SV40T</sup> *in vitro*, os eixos Y dos gráficos estão em escala logarítmica. À esquerda, estimativa baseada no número de cópias do genoma viral por μL de reação (estimada pela quantificação de cópias do gene viral BGLF5 por qPCR). À direita, quantificação relativa do número de cópias do gene BGLF5 do EBV em relação ao número de cópias do gene TNF-α (pTNF-α -862) em células NP69<sup>SV40T</sup> infectadas com as diferentes quantidades de vírus, indicando valores de duas réplicas técnicas e sua média. Dados referentes à um experimento.

A fim de se verificar se o protocolo estabelecido seria adequado para infecção pelo EBV de outra linhagem de células imortalizadas de epitélio de nasofaringe, o experimento de infecção foi reproduzido em células NP460 empregando sobrenadante proveniente de células Akata-Cas9 infectadas e contendo  $6,9 \times 10^5$  partículas/μL (MOI: 347,9). O sucesso na aplicação do protocolo estabelecido é notado pelo resultado da amplificação por qPCR do gene viral BGLF5 do EBV, apresentado na Figura 8. Nesse experimento, o número de cópias do genoma do EBV nas células NP460 infectadas foi estimado em  $1,021 \times 10^3$  cópias.



**Figura 8:** Curva de amplificação linear de qPCR para o gene BGLF5 do EBV a partir de DNA total extraído de células NP460<sup>hTert</sup> em amostras submetidas ao sobrenadante derivado de células Akata-Cas9 infectadas, contendo partículas virais livre (EBV+) e sobrenadante de células não-infectadas, como controle negativo (NC). Dados referentes à um experimento.

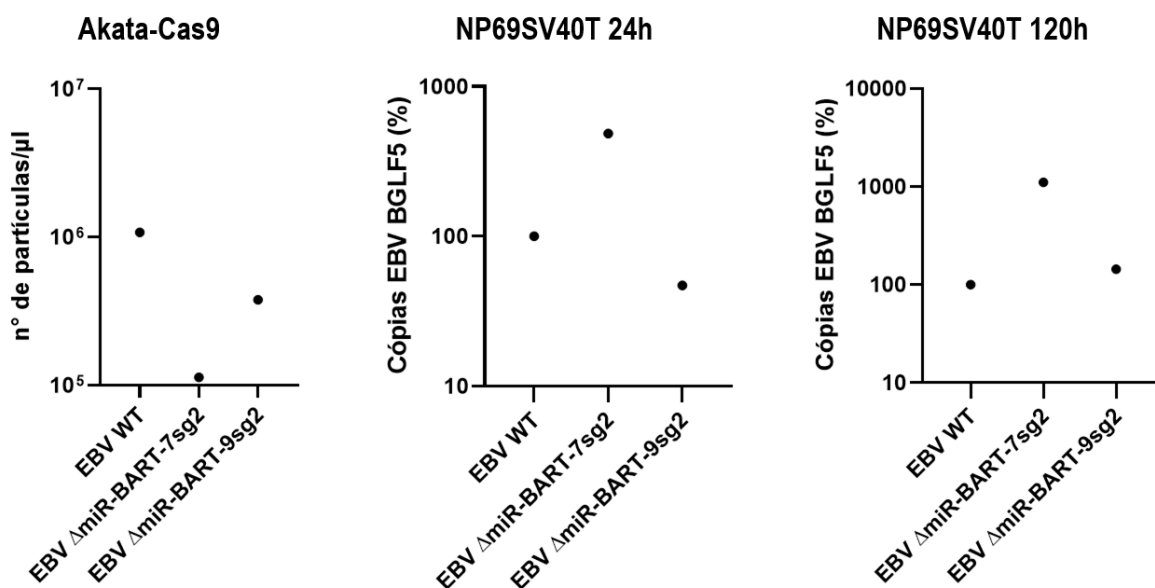
Os experimentos descritos até o momento para o estabelecimento do protocolo de infecção utilizaram partículas do EBV WT. Baseado nos resultados obtidos, os experimentos foram reproduzidos empregando as partículas virais com comprometimento dos miR-BARTs 7 (EBV- $\Delta$ miR-BART-7sg2) e 9 (EBV- $\Delta$ miR-BART-9sg2), geradas por indução de ciclo lítico em células Akata-Cas9 EBV-positivas submetidas a edição do genoma viral com tecnologia CRISPR/Cas9. Em síntese, linhagens Akata-Cas9 EBV-WT, Akata-Cas9-EBV- $\Delta$ miR-BART-7sg2 e Akata-Cas9-EBV- $\Delta$ miR-BART-9sg2 foram tratadas quimicamente (TPA+SB) para produção de partículas virais, conforme previamente indicado.

Originalmente buscava-se seleção por antibiótico das células infectadas para estabelecimento de linhagem estável; por essa razão, os sobrenadantes provenientes das células Akata-Cas9 induzidas foram utilizados sem uniformização de quantidades na infecção de células não-infectadas Akata-Cas9 (controle) e NP69, em 24h e 120h. A infecção com partículas EBV WT, EBV- $\Delta$ miR-BART-7sg2 e EBV- $\Delta$ miR-BART-9sg2 tiveram MOIs de 536, 56,4 e 188,1, respectivamente. Assim sendo, procedeu-se ponderação dos dados pelos respectivos valores de MOI, de forma a permitir comparação entre os grupos.

Os resultados apresentados na Figura 9 revelam que houve infecção das células Akata-Cas9 e NP69 em todas as 3 condições (partículas do EBV WT ou com comprometimento dos miR-BARTs 7 ou 9). Entretanto, as versões editadas do EBV apresentaram diferentes eficiências de infecção quando comparadas com as partículas WT em 24h pós-infecção (p.i.). Partículas EBV  $\Delta$ miR-BART-7sg2 proporcionaram eficiência de infecção elevada quando

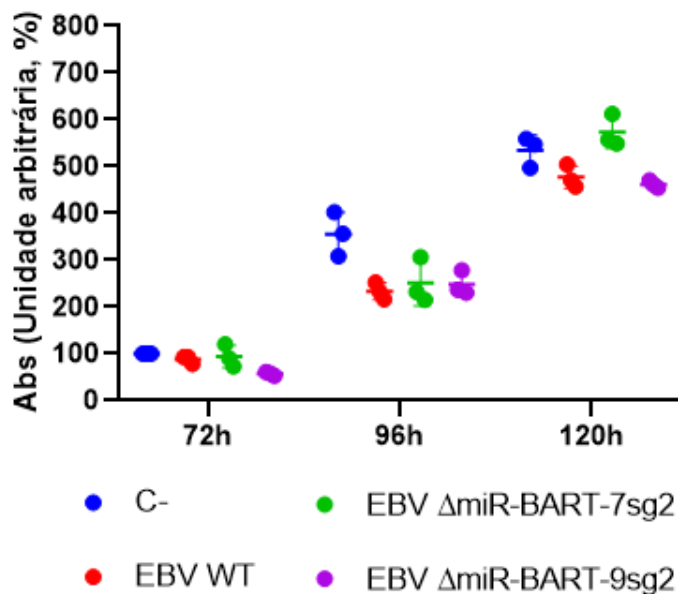


comparada com a versão selvagem nos dois tempos analisados, enquanto EBV  $\Delta$ miR-BART-9sg2 apresentou eficiência de infecção diminuída 24h p.i. e aumentada 120h p.i., quando comparados com EBV WT.



**Figura 9:** Avaliação do número de cópias do genoma do EBV baseada no número de cópias do gene BGLF5 estimada por qPCR, os eixos Y dos gráficos estão em escala logarítmica. À esquerda, estimativa da quantidade de partículas virais obtidas no sobrenadante de células Akata-Cas9 infectadas com EBV após indução química do ciclo lítico. Quantidade de partículas normalizada pelo número de partículas/μL de sobrenadante não-tratado com DNase e proteinase K. As quantidades estimadas de partículas obtidas são descritas a seguir: EBV WT  $1,07 \times 10^6$  partículas/μL, com comprometimento do miR-BART7 (EBV  $\Delta$ miR-BART-7sg2)  $1,1 \times 10^5$  partículas/μL, e com comprometimento do miR-BART9 (EBV  $\Delta$ miR-BART-9sg2)  $3,7 \times 10^5$  partículas/μL. Os gráficos intermediário e da direita apresentam a estimativa de cópias do gene BGLF5 do EBV em células NP69<sup>SV40T</sup> em 24h e 120h pós-infecção, respectivamente, comparativamente ao resultado obtido nas células infectadas com partículas do EBV sem edição dos miR-BARTs (EBV WT). Resultados ponderados pelos respectivos valores de MOI, de forma a permitir comparação entre os grupos. Dados referentes à um experimento.

Subsequentemente, as células NP69 infectadas tiveram sua viabilidade avaliada por ensaio de MTT (Figura 10). Os resultados obtidos demonstram que as células infectadas com EBV WT e EBV  $\Delta$ miR-BART-9sg2 apresentaram taxas de viabilidade menores que células não infectadas em todos os tempos analisados, enquanto células infectadas com EBV  $\Delta$ miR-BART-7sg2 apresentaram comportamento similar nos tempos 72h e 96h, e 120h p.i. apresentou taxa de viabilidade levemente mais elevada que células não infectadas.



**Figura 10:** Ensaio utilizando o reagente brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) nas células NP69SV40T infectadas com partículas virais na forma selvagem (WT) ou com edição dos miR-BARTs 7 (EBV  $\Delta$ miR-BART-7sg2) ou 9 (EBV  $\Delta$ miR-BART-9sg2) nos tempos 72h, 96h e 120h após a infecção das células. As células foram semeadas em placas de 96 poços 24h após a infecção, após 24h foram privadas de soro fetal bovino (FBS) (48h pós infecção), e então após 24h, (72h pós infecção) foi iniciada a primeira leitura do ensaio de MTT. Absorbância relativa calculada após normalização em relação a células NP69SV40T não infectadas e expressa em forma percentual. Dados referentes à um experimento com três replicatas técnicas, no gráfico são mostradas as replicatas técnicas, média e desvio padrão.

## 5 Discussão

Neste estudo foram estabelecidos um modelo e protocolos experimentais para propiciar futuras investigações sobre a contribuição dos miR-BARTs 7 e 9 do EBV em propriedades biológicas potencialmente relevantes na patogênese do NPC. O modelo é baseado em linhagens de células imortalizadas derivadas de epitélio de nasofaringe (e.g., NP69<sup>SV40T</sup>, NP460<sup>hTert</sup>) e infectadas com partículas virais do EBV produzidas por células Akata-Cas9 (derivada de BL (Kanda et al. 2004)), quer sejam do vírus com genoma selvagem ou editado para comprometimento das sequências codificadoras do miR-BARTs 7 ou 9 empregando tecnologia CRISPR/Cas9 de edição genômica. Este sistema necessita de duas ferramentas para que a edição seja realizada, a proteína Cas9, para clivagem do genoma, e um RNA guia (gRNA), que direciona a Cas9 para o local de clivagem. Até o momento não foram relatados efeitos adicionais causados pela presença da proteína Cas9 e do gRNA em células Akata-Cas9, indicando que este pode ser um fator negativo em relação ao sistema de edição. Por outro lado, a utilização de duas ferramentas contribui para a aplicabilidade da técnica, adicionalmente, o uso do gRNA torna a edição genômica com o sistema CRISPR/Cas9 altamente específica.

A produção de partículas do EBV depende da reativação lítica viral, o que pode ser obtido experimentalmente *in vitro* com tratamento com certos agentes químicos como o SB, um conhecido inibidor da enzima histona deacetilase, e/ou TPA, um ativador da enzima proteína quinase C (*protein kinase C* – PKC) (McKenzie e El-Guindy 2015). *In vivo*, a indução do ciclo lítico do EBV ocorre por diferentes estímulos da célula infectada, tais como TGF- $\beta$ , hipóxia, espécies reativas de oxigênio e ativação do receptor de células B (*B cell receptor* - BCR) (Murata et al. 2021). Por diferentes mecanismos, todos esses modos de indução convergem para elevação da expressão dos genes BZLF1 (Zta) e BRLF1 (Rta) do EBV. Expressos imediatamente na deflagração do ciclo lítico viral, esses genes desencadeiam a expressão de proteínas do EBV envolvidas na replicação do genoma do vírus e produção de novas partículas virais, fenômeno este que se dá tardiamente no ciclo lítico, quando são expressas proteínas estruturais necessárias à montagem do vírus na célula infectada (Murata et al. 2021). Neste trabalho, o tratamento combinado de TPA+SB propiciou indução de ciclo lítico viral, o que foi constatado pela expressão em nível transcricional dos genes BZLF1 e gp350 (Figura 3) – expressos nas fases inicial imediata e tardia do ciclo lítico, respectivamente.

A ativação de BCR com anticorpos anti-IgG é utilizada como alternativa de indução de ciclo lítico do EBV para produção de partículas virais *in vitro*. Não há consenso na literatura sobre a concentração de anticorpo anti-IgG necessária para indução do ciclo lítico, sendo possível encontrar diversas concentrações, tais como 5µg/mL (Pang et al. 2019), 10µg/mL (Kraus et al. 2020) ou mesmo 100µg/mL (Lan et al. 2007). Como foi mostrado na Figura 6, definimos algumas concentrações de IgG humana para estabelecer o método de indução apropriado aos propósitos deste trabalho. A indução com anticorpos anti-IgG apresenta como vantagem maior similaridade com a via de ativação biológica, o que tornaria o modelo mais fidedigno, por outro lado, podem existir efeitos celulares ainda desconhecidos. A indução química utilizando TPA+SB é comumente utilizada e validada por diversos trabalhos (Anisimová et al. 1984; Takasaka et al. 1998; Lan et al. 2007; Gonnella et al. 2015), apresenta concentração previamente estabelecida, o que contribui para a reprodutibilidade dos experimentos. Adicionalmente as colocações anteriores, dado que a quantidade de partículas produzidas via tratamento TPA+SB foi similar à quantidade produzida após tratamento com anti-IgG, optou-se por manter a indução química (TPA+SB) do ciclo lítico do EBV.

Uma etapa importante para validar a indução é a quantificação das partículas virais produzidas. A detecção e quantificação de partículas virais pode ser realizada utilizando microscópios eletrônicos, avaliação de material genético do vírus, em ensaios como hibridização *in situ* fluorescente (*fluorescence in situ hybridization* – FISH) (Pang et al. 2019), ou por curva-padrão empregando, por exemplo, células da linhagem Namalwa, derivada de BL e que contém número conhecido de 2 cópias do genoma do EBV por célula (Feederle et al. 2006). Neste trabalho optou-se por empregar o genoma B95-8 do EBV, comercialmente disponível, para construção de uma curva-padrão que permite estimar o número de cópias virais com base na massa calculada do genoma viral. Essa abordagem apresenta como limitação ser um método indireto de quantificação, no entanto, continua sendo vantajosa devido a sensibilidade intrínseca a técnica de qPCR, que mesmo em baixos níveis, é possível verificar a presença de DNA viral.

Estabelecida a forma de quantificação do genoma viral (discriminando-se o EBV intracelular ou na forma de partículas livres, o que foi possível pela utilização de amostras diferentes, células infectadas ou sobrenadante de cultura celular, respectivamente), foi estabelecida a estratégia experimental de infecção *in vitro* de células humanas de epitélio de nasofaringe. Para se alcançar maior eficiência de infecção pode ser realizada a concentração

---

das partículas virais por ultracentrifugação; nesse caso, a infecção pode ser realizada com adição das partículas às células alvo, e incubação por tempo determinado (Janz et al. 2000). Uma alternativa à ultracentrifugação é o enriquecimento da quantidade de partículas utilizando filtros para centrífuga, mas esse procedimento pode ocasionar perda substancial das partículas produzidas.

Optamos por efetuar a infecção utilizando sobrenadante celular contendo partículas virais, sem concentração. A fim de elevar a eficiência de infecção, o protocolo adotado emprega etapas sucessivas de centrifugação celular após adição das partículas virais juntamente com brometo de hexadimetrina. Esses procedimentos favorecem o contato célula-vírus, de modo a se elevar as taxas de infecção. Inicialmente foi realizado uma etapa de padronização para verificar qual o volume de sobrenadante celular contendo as partículas virais seria utilizado na infecção. Três volumes foram determinados, como esperado, a condição que apresentou maior eficiência de infecção foi 10% do volume contendo partículas virais, como representado na Figura 7, por meio de estimativa do número de cópias do genoma do EBV em células NP69 e após quantificação relativa utilizando um gene humano como referência. Em síntese, o procedimento adotado permitiu estabelecimento de um modelo de estudo da infecção de células epiteliais de nasofaringe pelo EBV, por outro lado, a possibilidade de uma baixa taxa de infecção devido à baixa concentração de partículas virais no sobrenadante celular, dificulta a observação de alguns parâmetros importantes para avaliar a infecção, e posteriormente a ação dos miR-BARTs do EBV.

Dentre as linhagens epiteliais derivadas de nasofaringe disponíveis para estudo, a linhagem NP460 constitui um melhor modelo de estudo em relação às células NP69 devido a forma de imortalização. A linhagem NP460 é imortalizada pela expressão da unidade catalítica da telomerase humana, enquanto a NP69 é imortalizada pela expressão da oncoproteína TAg (*Large T antigen*) do vírus símio 40 (SV40). A utilização da linhagem NP69 para estudo do processo de carcinogênese é menos interessante devido a expressão da oncoproteína viral do SV40. Quando estabelecida, parâmetros de similaridade com células epiteliais primárias foram avaliados e concluiu-se que este era um bom modelo de estudo para tumorigênese do NPC (Tsao et al. 2002), entretanto, faltam informações sobre interações da proteína TAg nesta linhagem. Dessa forma, pode haver interferência nos processos celulares pela expressão da oncoproteína do TAg, dificultando a distinção dos efeitos causados pela infecção pelo EBV ou pela expressão da oncoproteína.

---

Os resultados apresentados na Figura 8 revelam que infecção da NP460 com o mesmo protocolo estabelecido para células NP69 foi eficiente, demonstrando que o procedimento é adequado para diferentes linhagens de células humanas imortalizadas de epitélio nasofaríngeo. Inicialmente os experimentos de infecção empregaram sobrenadante contendo partículas livres do EBV em sua forma selvagem (WT), sendo subsequentemente empregado para análise da infecção pelas formas editadas para os miR-BARTs 7 e 9. A indução de ciclo lítico nas células Akata-Cas9 infectadas pelo EBV revelou uma menor produção de partículas virais nas células com comprometimento dos miR-BARTs 7 (EBV- $\Delta$ miR-BART-7sg2) ou 9 (EBV- $\Delta$ miR-BART-9sg2) em relação às células contendo o genoma viral em sua forma selvagem (EBV WT) (Figura 9). Esse resultado sugere que o comprometimento da expressão dos miR-BARTs 7 e 9 interferiu de forma substancial no processo de produção de partículas, causando diminuição pronunciada na quantidade de partículas geradas por células infectadas por EBV- $\Delta$ miR-BART-7sg2 ou EBV- $\Delta$ miR-BART-9sg2 após indução de ciclo lítico. Por outro lado, é importante destacar que esse resultado é proveniente de um único experimento, portanto, para afirmar com propriedade, outros experimentos iguais deveriam ser realizados. Por fim, caso fosse confirmada a participação dos miR-BARTs 7 e 9 no processo de produção de partículas virais, a realização de outros ensaios, alguns citados anteriormente nesta seção, como microscopia eletrônica, seriam de grande importância para enriquecer a análise.

Subsequentemente, as partículas EBV WT, EBV  $\Delta$ miR-BART-7sg2 e EBV  $\Delta$ miR-BART-9sg2 foram utilizadas para infecção de células NP69. A infecção foi efetiva em todas as condições experimentais; 120h p.i. as células infectadas com as versões editadas do EBV apresentaram aumento do número de cópias do genoma do EBV comparativamente às células infectadas com EBV WT (Figura 9). Os resultados preliminares apresentados neste trabalho sugerem uma possível participação dos miR-BARTs 7 e 9 do EBV estimulando a produção de partículas, dado que a deficiência desses causou uma diminuição da quantidade de partículas produzidas, indicando papel regulatório na expressão de componentes do ciclo lítico, no entanto, não há dados na literatura que corroborem essa hipótese, os dados existentes demonstram regulação de componentes de ciclo lítico por miR-BARTs do EBV de forma a contribuir para manutenção da latência viral (Jung et al. 2014). Diferentemente dos dados de produção de partículas, a deficiência de expressão dos miR-BARTs 7 e 9 causou maior eficiência de infecção, indicando que esses miR-BARTs contribuem para dificultar a infecção de novas células.

Ainda são escassos os dados sobre os efeitos dos miR-BARTs 7 e 9 em células infectadas pelo EBV. Os dados existentes são relativos a atuação em processos carcinogênicos, após desenvolvimento da doença, por exemplo, é descrito que miR-BART 7 tem expressão elevada no plasma de pacientes com NPC (Zhang et al. 2015; Gao et al. 2018), sugerindo que esse miRNA do EBV possa ser um biomarcador útil na detecção e monitoramento do NPC. Em trabalho publicado em 2020, Lu e colaboradores relataram que a superexpressão de miR-BART 7-3p em plasma de pacientes com NPC esteve relacionado a maior risco para desenvolvimento de metástases. Ademais, pacientes com superexpressão de miR-BART 7-3p e grande quantidade de DNA do EBV apresentaram menor taxa de sobrevivência em relação a pacientes com baixa expressão (Lu et al. 2020).

Em células TRAIL-resistentes de câncer de pulmão de células não pequenas (*non-small cell lung cancer* - NSCLC) das linhagens A549 (RRID: CVCL\_0023), Calu-1 (RRID: CVCL\_0608), H1299 (RRID: CVCL\_0060) e H460R (RRID: CVCL\_UW76), miR-BART 7 foi descrito com expressão aumentada quando comparado às células TRAIL-sensíveis das linhagens H292 e H460S (Wang et al. 2019). A inibição de miR-BART 7 causou diminuição da proliferação e aumento de apoptose dessas células TRAIL-resistentes (Wang et al. 2019). Além do papel deste miRNA na migração e invasão das linhagens derivadas de HeLa CNE-1 e 5-8F (Cai et al. 2015), miR-BART 7 também foi associado a indução de características similares a de células tronco, *in vitro*. A expressão ectópica de miR-BART 7 nas linhagens CNE-2 e 5-8F (ambas HeLa), induziu aumento de expressão (em nível transcricional e proteico) de marcadores de células tronco, como ABCG2, Nanog, OCT4 e SOX2, e aumento na quantidade de células de população lateral, caracterizadas por alto índice proliferativo e capacidade de auto renovação (Cai et al. 2019).

A superexpressão de miR-BART 9-5p no plasma de pacientes com NPC (Gao et al. 2018) também foi relatada, fortalecendo hipóteses sobre sua participação no desenvolvimento e evolução desses cânceres. miR-BART9 regula a expressão da proteína MALT, envolvida na ativação de linfócitos via receptor de célula B (BCR) por meio da ativação de NFkB (Chen et al. 2019). Uma vez que a ativação de linfócitos B está associada a reativação do ciclo lítico do EBV (Murata e Tsurumi 2014), participar da inibição desse processo sugere que miR-BART 9 pode ter papel na manutenção da latência viral. Ademais, miR-BART 9 foi descrito com elevada expressão em amostras de carcinoma gástrico quando comparado a tecido não neoplásico. O *knock-down* desse miRNA em células SNU-719, derivadas de adenocarcinoma gástrico, promoveu aumento da proteína caderina E e diminuiu expressão de vimentina, assim como a proliferação e invasão celular (Tsai et al. 2017).

A participação dos miR-BARTs 7 e 9 na carcinogênese induzida pelo EBV em humanos tem sido relatada por diferentes grupos de pesquisa (Cai et al. 2015; Wong et al. 2018; Hsu et al. 2014; Ramakrishnan et al. 2011; Lung et al. 2018). Ainda assim, a importância desses miRNAs do EBV na aquisição de características permissivas a malignização de células de epitélio de nasofaringe requer maior investigação. Novos estudos nesse contexto podem se beneficiar dos dados gerados neste trabalho, que descreve o estabelecimento de modelo experimental e protocolos para indução de ciclo lítico, produção e quantificação de partículas virais e infecção de linhagem de células epiteliais derivadas de nasofaringe.

Com as devidas adaptações, o modelo e protocolos propostos podem ser utilizados para diversas análises de parâmetros comumente investigados para elucidar mudanças no fenótipo de células humanas cultivadas *in vitro*, tais como proliferação e morte celular, migração, invasão e capacidade de formação de colônia, etc. Esses parâmetros são importantes pois são frequentemente afetados durante o processo de carcinogênese, incluindo a carcinogênese do NPC.



## **6 Conclusão**

O presente trabalho demonstra o estabelecimento de protocolos para:

1. Produção de partículas virais do EBV, com o genoma na forma selvagem ou com comprometimento da expressão dos miR-BARTs 7 e 9;
2. Estabelecimento de protocolo de indução de ciclo lítico para produção de partículas virais com e sem edição dos miR-BARTs 7 e 9;
3. Estabelecimento de protocolo de infecção de células imortalizadas derivadas de epitélio de nasofaringe pelo EBV.

Esses protocolos permitirão o estudo da função dos miR-BART 7 e 9 em diferentes contextos, desde a infecção viral até o envolvimento na patogênese do carcinoma de nasofaringe.

---

## 7 Referências Bibliográficas

- Abedon, S.T., e E. Bartom. 2013. "Multiplicity of Infection". Em *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, editado por Stanley Maloy e Kelly Hughes, 509–10. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00989-X>.
- Anisimová, E, K Prachová, J Roubal, e V Vonka. 1984. "Effects of N-Butyrate and Phorbol Ester (TPA) on Induction of Epstein-Barr Virus Antigens and Cell Differentiation". *Archives of Virology*, fevereiro, 15. <https://doi.org/10.1007/BF01309995>.
- Barth, Stephanie, Gunter Meister, e Friedrich A. Grässer. 2011. "EBV-Encoded MiRNAs". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1809 (11–12): 631–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.05.010>.
- Bjornevik, Kjetil, Marianna Cortese, Brian C Healy, Jens Kuhle, Michael J Mina, Yumei Leng, Stephen J Elledge, et al. 2022. "Longitudinal Analysis Reveals High Prevalence of Epstein-Barr Virus Associated with Multiple Sclerosis", 7.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, e Ahmedin Jemal. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Caetano, Brunno F R. 2022. "Efeitos de MiR-BARTs Do Vírus de Epstein-Barr Nas Propriedades in Vitro de Células Derivadas de Linfomas Humanos e Na Modulação de Vias de Sinalização Intracelular Envolvidas Na Linfomagênese", janeiro, 140.
- Caetano, Brunno F R, Beatrice Adriane S. Jorge, Bárbara Grasielle Müller-Coan, e Deilson Elgui de Oliveira. 2021. "Epstein-Barr Virus MicroRNAs in the Pathogenesis of Human Cancers". *Cancer Letters* 499 (fevereiro): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.11.019>.
- Cai, L-M, X-M Lyu, W-R Luo, X-F Cui, Y-F Ye, C-C Yuan, Q-X Peng, et al. 2015. "EBV-MiR-BART7-3p Promotes the EMT and Metastasis of Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Suppressing the Tumor Suppressor PTEN". *Oncogene* 34 (17): 2156–66. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.341>.
- Cai, Longmei, Yufei Long, Tuotuo Chong, Wenzhi Cai, Chi Man Tsang, Xiaohan Zhou, Yanling Lin, et al. 2019. "EBV-miR-BART7-3p Imposes Stemness in Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Suppressing SMAD7". *Frontiers in Genetics* 10 (outubro). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00939>.
- Cai, Longmei, Yanfen Ye, Qiang Jiang, Yuxiang Chen, Xiaoming Lyu, Jinbang Li, Shuang Wang, et al. 2015. "Epstein-Barr virus-encoded microRNA BART1 induces tumour metastasis by regulating PTEN-dependent pathways in nasopharyngeal carcinoma". *Nature Communications* 6 (julho). <https://doi.org/10.1038/ncomms8353>.
- Chan, Jennifer A., Anna M. Krichevsky, e Kenneth S. Kosik. 2005. "MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells". *Cancer Research* 65 (14): 6029–33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0137>.
- Chan, Jimmy Yu-Wai, Wei Gao, Wai-Kuen Ho, William Ignace Wei, e Thian-Sze Wong. 2012. "Overexpression of Epstein-Barr Virus-Encoded MicroRNA- BART7 in Undifferentiated Nasopharyngeal Carcinoma". *ANTICANCER RESEARCH*, 10.
- Chan, Sylvia Yat-Yee, Kwong-Wai Choy, Sai-Wah Tsao, Qian Tao, Tao Tang, Grace Tin-Yun Chung, e Kwok-Wai Lo. 2008. "Authentication of Nasopharyngeal Carcinoma Tumor Lines". *International Journal of Cancer* 122 (9): 2169–71. <https://doi.org/10.1002/ijc.23374>.
- Chandran, Bala, e Lindsey Hutt-Fletcher. 2007. "Gammaherpesviruses entry and early events during infection". Em *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47405/>.
- Chen, Yan, Devin Fachko, Nikita S. Ivanov, Camille M. Skinner, e Rebecca L. Skalsky. 2019. "Epstein-Barr virus microRNAs regulate B cell receptor signal transduction and lytic reactivation". *PLoS Pathogens* 15 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007535>.
-

- Chen, Yu-Pei, Anthony T C Chan, Quynh-Thu Le, Pierre Blanchard, Ying Sun, e Jun Ma. 2019. "Nasopharyngeal Carcinoma". *The Lancet* 394 (10192): 64–80. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30956-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30956-0).
- Cimmino, Amelia, George Adrian Calin, Muller Fabbri, Marilena V. Iorio, Manuela Ferracin, Masayoshi Shimizu, Sylwia E. Wojcik, et al. 2005. "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2", *The National Academy of Sciences of the USA*, 102 (39). <https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.0506654102>.
- Elgui de Oliveira, Deilson, Bárbara G. Müller-Coan, e Joseph S. Pagano. 2016. "Viral Carcinogenesis Beyond Malignant Transformation: EBV in the Progression of Human Cancers". *Trends in Microbiology* 24 (8): 649–64. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.008>.
- Epstein, M.A, B.G Achong, e Y.M Barr. 1964. "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma". *The Lancet* 283 (7335): 702–3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)91524-7).
- Feederle, R., H. Bannert, H. Lips, N. Müller-Lantsch, e H.-J. Delecluse. 2009. "The Epstein-Barr Virus Alkaline Exonuclease BGLF5 Serves Pleiotropic Functions in Virus Replication". *Journal of Virology* 83 (10): 4952–62. <https://doi.org/10.1128/JVI.00170-09>.
- Feederle, R., B. Neuhierl, G. Baldwin, H. Bannert, B. Hub, J. Mautner, U. Behrends, e H. J. Delecluse. 2006. "Epstein-Barr Virus BNRF1 Protein Allows Efficient Transfer from the Endosomal Compartment to the Nucleus of Primary B Lymphocytes". *Journal of Virology* 80 (19): 9435–43. <https://doi.org/10.1128/JVI.00473-06>.
- Ferraz da Silva, Ana Paula, Leila Bertoni Giron, Suzane Ramos da Silva, Alexandre Naime Barbosa, Ricardo Augusto Monteiro de Barros Almeida, e Deilson Elgui de Oliveira. 2015. "Human Gammaherpesviruses Viraemia in HIV Infected Patients". *Journal of Clinical Pathology* 68 (9): 726–32. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202840>.
- Gao, Wei, Thian-Sze Wong, Ke-Xing Lv, Min-Juan Zhang, Raymond King-Yin Tsang, e Jimmy Yu-Wai Chan. 2018. "Detection of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded MicroRNAs in Plasma of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma". *Head & Neck*, dezembro, hed.25544. <https://doi.org/10.1002/hed.25544>.
- Gonnella, Roberta, Marisa Granato, Antonella Farina, Roberta Santarelli, Alberto Faggioni, e Mara Cirone. 2015. "PKC Theta and P38 MAPK Activate the EBV Lytic Cycle through Autophagy Induction". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853 (7): 1586–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.011>.
- Grey, F. 2015. "Role of MicroRNAs in Herpesvirus Latency and Persistence". *Journal of General Virology* 96 (Pt\_4): 739–51. <https://doi.org/10.1099/vir.0.070862-0>.
- Grundhoff, Adam, e Christopher S. Sullivan. 2011. "Virus-encoded microRNAs". *Virology* 411 (2): 325–43. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.002>.
- Hanahan, Douglas, e Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation". *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hau, Pok, e Sai Tsao. 2017. "Epstein-Barr Virus Hijacks DNA Damage Response Transducers to Orchestrate Its Life Cycle". *Viruses* 9 (11): 341. <https://doi.org/10.3390/v9110341>.
- Heslop, H. E. 2009. "How I Treat EBV Lymphoproliferation". *Blood* 114 (19): 4002–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-143545>.
- Hsu, Chung-Yuan, Yung-Hsiang Yi, Kai-Ping Chang, Yu-Sun Chang, Shu-Jen Chen, e Hua-Chien Chen. 2014. "The Epstein-Barr Virus-Encoded MicroRNA MiR-BART9 Promotes Tumor Metastasis by Targeting E-Cadherin in Nasopharyngeal Carcinoma". *PLoS Pathogens* 10 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003974>.
- IARC Working Group. 2012. *Biological Agents, Volume 100B A Review of Human Carcinogens*. Vol. 100B. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Janz, Annette, Muhsin Oezel, Christian Kurzeder, Josef Mautner, Dagmar Pich, Manuela Kost, Wolfgang Hammerschmidt, e Henri-Jacques Delecluse. 2000. "Infectious Epstein-Barr Virus Lacking Major Glycoprotein BLLF1 (Gp350/220) Demonstrates the Existence of Additional Viral Ligands". *Journal of Virology* 74 (21): 10142–52. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.21.10142-10152.2000>.
-

- Jung, Yu-Jin, Hoyun Choi, Hyoji Kim, e Suk Kyeong Lee. 2014. "MicroRNA miR-BART20-5p Stabilizes Epstein-Barr Virus Latency by Directly Targeting BZLF1 and BRLF1". *Journal of Virology* 88 (16): 9027–37. <https://doi.org/10.1128/JVI.00721-14>.
- Kanda, Teru, Misako Yajima, Nazmul Ahsan, Mika Tanaka, e Kenzo Takada. 2004. "Production of High-Titer Epstein-Barr Virus Recombinants Derived from Akata Cells by Using a Bacterial Artificial Chromosome System". *Journal of Virology* 78 (13): 7004–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.7004-7015.2004>.
- Kang, Dong, Rebecca L. Skalsky, e Bryan R. Cullen. 2015. "EBV BART MicroRNAs Target Multiple Proapoptotic Cellular Genes to Promote Epithelial Cell Survival". *PLoS Pathogens* 11 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004979>.
- Kang, Myung-Soo, e Elliott Kieff. 2015. "Epstein-Barr Virus Latent Genes". *Experimental & Molecular Medicine* 47 (1): e131–e131. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.84>.
- Kozomara, Ana, Maria Birgaoanu, e Sam Griffiths-Jones. 2019. "MiRBase: From MicroRNA Sequences to Function". *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D155–62. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.
- Kraus, Richard J, Blue-leaf A Cordes, Saraniya Sathiamoorthi, Parita Patel, Xueying Yuan, Tawin Iempridee, Xianming Yu, Denis L Lee, Paul F Lambert, e Janet E Mertz. 2020. "Reactivation of Epstein-Barr Virus by HIF-1  $\alpha$  Requires P53". *Journal of Virology* 94 (18): 16.
- Kutok, J.L., e F. Wang. 2006. "Spectrum of Epstein-Barr Virus-Associated Diseases". *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1 (1): 375–404. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100209>.
- Labun, Kornel, Tessa G Montague, Maximilian Krause, Yamila N Torres Cleuren, Håkon Tjeldnes, e Eivind Valen. 2019. "CHOPCHOP v3: Expanding the CRISPR Web Toolbox beyond Genome Editing". *Nucleic Acids Research* 47 (W1): W171–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>.
- Lan, Ke, Subhash C. Verma, Masanao Murakami, Bharat Bajaj, e Erle S. Robertson. 2007. "Epstein-Barr Virus (EBV): Infection, Propagation, Quantitation, and Storage". *Current Protocols in Microbiology* 6 (1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc14e02s6>.
- Lee, Yong Sun, e Anindya Dutta. 2009. "MicroRNAs in cancer". *Annual review of pathology* 4: 199–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222>.
- Li, H. M., C. Man, Y. Jin, W. Deng, Y. L. Yip, H. C. Feng, Y. C. Cheung, et al. 2006. "Molecular and Cytogenetic Changes Involved in the Immortalization of Nasopharyngeal Epithelial Cells by Telomerase". *International Journal of Cancer* 119 (7): 1567–76. <https://doi.org/10.1002/ijc.22032>.
- Li, Hongde, Sufang Liu, Jianmin Hu, Xiangjian Luo, Namei Li, Ann M. Bode, e Ya Cao. 2016. "Epstein-Barr virus lytic reactivation regulation and its pathogenic role in carcinogenesis". *International Journal of Biological Sciences* 12 (11): 1309–18. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16564>.
- Lin, Cheng, Jingfeng Zong, Wansong Lin, Minghui Wang, Yuanji Xu, Rui Zhou, Shaojun Lin, et al. 2018. "EBV-MiR-BART8-3p Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Promotes Metastasis of Nasopharyngeal Carcinoma Cells through Activating NF- $\kappa$ B and Erk1/2 Pathways". *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 37 (1): 283. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0953-6>.
- Longnecker, Richard M., Elliott Kieff, e Jeffrey I. Cohen. 2013. "Epstein-Barr Virus". Em *Fields Virology*, 6<sup>o</sup> ed, 2:1898–1959. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lu, Tianzhu, Qiaojuan Guo, Keyu Lin, Honglin Chen, Yixin Chen, Yuanji Xu, Cheng Lin, et al. 2020. "Circulating Epstein-Barr Virus MicroRNAs BART7-3p and BART13-3p as Novel Biomarkers in Nasopharyngeal Carcinoma". *Cancer Science* n/a (n/a). <https://doi.org/10.1111/cas.14381>.
- Lung, Raymond W-M, Pok-Man Hau, Ken H-O Yu, Kevin Y Yip, Joanna H-M Tong, Wing-Po Chak, Anthony W-H Chan, et al. 2018. "EBV-encoded miRNAs target ATM-mediated response in nasopharyngeal carcinoma". *The Journal of Pathology* 244 (4): 394–407. <https://doi.org/10.1002/path.5018>.
- Martel, Catherine de, Damien Georges, Freddie Bray, Jacques Ferlay, e Gary M Clifford. 2020. "Global Burden of Cancer Attributable to Infections in 2018: A Worldwide Incidence Analysis". *The Lancet Global Health* 8 (2): e180–90. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7).
- McKenzie, Jessica, e Ayman El-Guindy. 2015. "Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Reactivation". Em *Epstein Barr Virus Volume 2*, editado por Christian Münz, 391:237–61. Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_8).

- Murata, Takayuki. 2018. "Encyclopedia of EBV-Encoded Lytic Genes: An Update". Em *Human Herpesviruses*, editado por Yasushi Kawaguchi, Yasuko Mori, e Hiroshi Kimura, 1045:395–412. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_18).
- Murata, Takayuki, Atsuko Sugimoto, Tomoki Inagaki, Yusuke Yanagi, Takahiro Watanabe, Yoshitaka Sato, e Hiroshi Kimura. 2021. "Molecular Basis of Epstein–Barr Virus Latency Establishment and Lytic Reactivation". *Viruses* 13 (12): 2344. <https://doi.org/10.3390/v13122344>.
- Murata, Takayuki, e Tatsuya Tsurumi. 2014. "Switching of EBV Cycles between Latent and Lytic States: Regulation of EBV Reactivation". *Reviews in Medical Virology* 24 (3): 142–53. <https://doi.org/10.1002/rmv.1780>.
- O'Brien, Jacob, Heyam Hayder, Yara Zayed, e Chun Peng. 2018. "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation". *Frontiers in Endocrinology* 9 (agosto): 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.
- Ok, Chi Young, Ling Li, e Ken H Young. 2015. "EBV-Driven B-Cell Lymphoproliferative Disorders: From Biology, Classification and Differential Diagnosis to Clinical Management". *Experimental & Molecular Medicine* 47 (1): e132–e132. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.82>.
- Pang, Pei Shin, Tengfei Liu, Weitao Lin, Chi Man Tsang, Yim-Ling Yip, Yuan Zhou, Xin-Yuan Guan, Ronald Cheong-Kin Chan, Sai-Wah Tsao, e Wen Deng. 2019. "Defining early events of Epstein–Barr virus (EBV) infection in immortalized nasopharyngeal epithelial cells using cell-free EBV infection". *Journal of General Virology*, fevereiro. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001243>.
- Peng, Yong, e Carlo M Croce. 2016. "The Role of MicroRNAs in Human Cancer". *Signal Transduction and Targeted Therapy* 1 (1): 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>.
- Pereira, Tiago Campos, org. 2016. *Introdução a técnica de CRISPR*. Ribeirão Preto / São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética.
- Pfeffer, S. 2004. "Identification of Virus-Encoded MicroRNAs". *Science* 304 (5671): 734–36. <https://doi.org/10.1126/science.1096781>.
- Plummer, Martyn, Catherine de Martel, Jerome Vignat, Jacques Ferlay, Freddie Bray, e Silvia Franceschi. 2016. "Global Burden of Cancers Attributable to Infections in 2012: A Synthetic Analysis". *The Lancet Global Health* 4 (9): e609–16. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7).
- Qiu, Jin, Pamela Smith, Leah Leahy, e David A. Thorley-Lawson. 2015. "The Epstein-Barr Virus Encoded BART MiRNAs Potentiate Tumor Growth In Vivo". Editado por Erik K Flemington. *PLOS Pathogens* 11 (1): e1004561. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004561>.
- Ramakrishnan, Rajesh, Hart Donahue, David Garcia, Jie Tan, Norio Shimizu, Andrew P. Rice, e Paul D. Ling. 2011. "Epstein-Barr Virus BART9 MiRNA Modulates LMP1 Levels and Affects Growth Rate of Nasal NK T Cell Lymphomas". Editado por Maria G. Masucci. *PLoS ONE* 6 (11): e27271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027271>.
- Robertson, E S, B Tomkinson, e E Kieff. 1994. "An Epstein-Barr virus with a 58-kilobase-pair deletion that includes BARF0 transforms B lymphocytes in vitro." *Journal of Virology* 68 (3): 1449–58.
- Rous, Peyton. 1911. "Transmission of a Malignant New Growth by Means of a Cell-Free Filtrate", janeiro.
- Schmittgen, Thomas D, e Kenneth J Livak. 2008. "Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method". *Nature Protocols* 3 (6): 1101–8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- Shannon-Lowe, Claire, Alan B. Rickinson, e Andrew I. Bell. 2017. "Epstein–Barr virus-associated lymphomas". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372 (1732). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0271>.
- Shukla, Girish C, Jagjit Singh, e Sailen Barik. 2012. "MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions", 14.
- Sixbey, John W., e Qing-Yun Yao. 1992. "Immunoglobulin A-Induced Shift of Epstein-Barr Virus Tissue Tropism". *Science* 255 (5051): 1578–80. <https://doi.org/10.1126/science.1312750>.
- Song, Yali, Xiaoling Li, Zhaoyang Zeng, Qiao Li, Zhaojian Gong, Qianjin Liao, Xiayu Li, et al. 2016. "Epstein-Barr virus encoded miR-BART11 promotes inflammation-induced carcinogenesis by targeting FOXP1". *Oncotarget* 7 (24): 36783–99. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9170>.
-

- Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, e Freddie Bray. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, fevereiro, caac.21660. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Tagawa, Takanobu, Manuel Albanese, Mickaël Bouvet, Andreas Moosmann, Josef Mautner, Vigo Heissmeyer, Christina Zielinski, et al. 2016. "Epstein-Barr Viral MiRNAs Inhibit Antiviral CD4<sup>+</sup> T Cell Responses Targeting IL-12 and Peptide Processing". *The Journal of Experimental Medicine* 213 (10): 2065–80. <https://doi.org/10.1084/jem.20160248>.
- Takada, Kenzo. 1984. "Cross-Linking of Cell Surface Immunoglobulins Induces Epstein-Barr Virus in Burkitt Lymphoma Lines". *International Journal of Cancer* 33 (1): 27–32. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910330106>.
- Takasaka, Noriko, Masako Tajima, Kota Okinaga, Yukio Satoh, Yoshiko Hoshikawa, Tetsuo Katsumoto, Takeshi Kurata, e Takeshi Sairenji. 1998. "Productive Infection of Epstein-Barr Virus (EBV) in EBV-Genome-Positive Epithelial Cell Lines (GT38 and GT39) Derived from Gastric Tissues". *Virology* 247 (2): 152–59. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9231>.
- Thorley-Lawson, David A. 2015. "EBV Persistence—Introducing the Virus". Em *Epstein Barr Virus Volume 1*, editado por Christian Münz, 390:151–209. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_8).
- Thorley-Lawson, David A., e Andrew Gross. 2004. "Persistence of the Epstein-Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas". *New England Journal of Medicine* 350 (13): 1328–37. <https://doi.org/10.1056/NEJMr032015>.
- Tsai, Chun-Yi, Yu Yin Liu, Keng-Hao Liu, Jun-Te Hsu, Tse-Ching Chen, Cheng-Tang Chiu, e Ta-Sen Yeh. 2017. "Comprehensive Profiling of Virus MicroRNAs of Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma: Highlighting the Interactions of Ebv-Bart9 and Host Tumor Cells". *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 32 (1): 82–91. <https://doi.org/10.1111/jgh.13432>.
- Tsai, Ming-Han, Xiaochen Lin, Anatoliy Shumilov, Katharina Bernhardt, Regina Feederle, Remy Poirey, Annette Kopp-Schneider, Bruno Pereira, Raquel Almeida, e Henri-Jacques Delecluse. 2017. "The Biological Properties of Different Epstein-Barr Virus Strains Explain Their Association with Various Types of Cancers". *Oncotarget* 8 (6). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14380>.
- Tsai, Ming-Han, Raykova, Ana, Klinke, Olaf, Bernhardt, Katharina, Gartner, Kathrin, Leung, Carol S., Geletneky, Karsten, et al. 2013. "Spontaneous Lytic Replication and Epitheliotropism Define an Epstein-Barr Virus Strain Found in Carcinomas". *Cell Reports*, outubro.
- Tsao, Sai Wah, Chi Man Tsang, e Kwok Wai Lo. 2017. "Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372 (1732). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0270>.
- Tsao, Sai Wah, Chi Man Tsang, Ka-Fai To, e Kwok-Wai Lo. 2015. "The Role of Epstein-Barr Virus in Epithelial Malignancies". *The Journal of Pathology* 235 (2): 323–33. <https://doi.org/10.1002/path.4448>.
- Tsao, Sai Wah, Xianghong Wang, Yu Liu, Yuk Chun Cheung, Huichen Feng, Zhong Zheng, Natalie Wong, et al. 2002. "Establishment of Two Immortalized Nasopharyngeal Epithelial Cell Lines Using SV40 Large T and HPV16E6/E7 Viral Oncogenes". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1590 (1–3): 150–58. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(02\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00208-2).
- Uemori, Takashi, Kiyozo Asada, Ikunoshin Kato, e Ryô Harasawa. 1992. "Amplification of the 16S-23S Spacer Region in RRNA Operons of Mycoplasmas by the Polymerase Chain Reaction". *Systematic and Applied Microbiology* 15 (2): 181–86. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80089-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80089-5).
- Wang, Lei, Li-fa Liu, Li Zhou, Fei Liao, e Ju Wang. 2019. "Effects of Ebv-MiR-BART7 on Tumorigenicity, Metastasis, and TRAIL Sensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer". *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (6): 10057–68. <https://doi.org/10.1002/jcb.28289>.
- Wong, Thian-Sze, Siqi Chen, Min-Juan Zhang, Jimmy Yu-Wai Chan, e Wei Gao. 2018. "Epstein-Barr virus-encoded microRNA BART7 downregulates major histocompatibility complex class I chain-related peptide A and reduces the cytotoxicity of natural killer cells to nasopharyngeal carcinoma". *Oncology Letters* 16 (3): 2887–92. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9041>.
-

- Xu, Feng-Hua, Dan Xiong, Ya-Fei Xu, Su-Mei Cao, Wen-Qiong Xue, Hai-De Qin, Wen-Sheng Liu, et al. 2012. "An Epidemiological and Molecular Study of the Relationship Between Smoking, Risk of Nasopharyngeal Carcinoma, and Epstein–Barr Virus Activation" 104 (18): 15.
- Xu, Xin, Haomin Yan, Le Zhang, Jing Liu, Yu Huang, e Haoyu Cheng. 2020. "Up-Regulation of MiR-34c-5p Inhibits Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Mediating NOTCH1". *Bioscience Reports* 40 (6): BSR20200302. <https://doi.org/10.1042/BSR20200302>.
- Young, Lawrence S., Lee Fah Yap, e Paul G. Murray. 2016. "Epstein–Barr Virus: More than 50 Years Old and Still Providing Surprises". *Nature Reviews Cancer* 16 (12): 789–802. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.92>.
- Zhang, Gaohong, Jingfeng Zong, Shaojun Lin, Rob J. A. Verhoeven, Shuang Tong, Yixin Chen, Mingfang Ji, et al. 2015. "Circulating Epstein–Barr Virus MicroRNAs MiR-BART7 and MiR-BART13 as Biomarkers for Nasopharyngeal Carcinoma Diagnosis and Treatment". *International Journal of Cancer* 136 (5): E301–12. <https://doi.org/10.1002/ijc.29206>.
- Zhou, Jun, Jian Lin, Cuihong Zhou, Xiaoyan Deng, e Bin Xia. 2011. "Cytotoxicity of Red Fluorescent Protein DsRed Is Associated with the Suppression of Bcl-XL Translation". *FEBS Letters* 585 (5): 821–27. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.013>.
-

## 8 Apêndice

### 8.1 Preâmbulo

Nesta seção são apresentados resultados adicionais, referentes aos experimentos realizados durante o treinamento de mestrado para construção de vetores contendo RNA-guias requeridos para edição gênica com tecnologia CRISPR/Cas9. Os vetores foram construídos visando a edição dos miR-BARTs 7 e 9 no genótipo M81 do EBV, que possui alta similaridade com outros genótipos virais isolados de amostras de NPC (Tsai, Ming-Han et al. 2013), além de apresentar maior tropismo de infecção de células epiteliais (Tsai et al. 2017). Assim, esses construtos são contribuição valiosa para enriquecimento do modelo experimental para estudo dos efeitos da importância da expressão dos miR-BARTs 7 e 9 do EBV em células de epitélio de nasofaringe. Esse genótipo foi generosamente cedido para o ViriCan pelo grupo liderado pelo Prof. Dr. Henri-Jacques Delecluse (Centro Alemão para Pesquisa do Cancer, Heidelberg, Alemanha), clonado no vetor-base pMBO131 (Tsai, Ming-Han et al. 2013).

O EBV M81 não está presente em nenhuma linhagem celular disponível no biorrepositório do grupo ViriCan, de modo que seria necessário estabelecer linhagem infectada especificamente com esse genótipo para análises sobre suas propriedades biológicas. Nessa perspectiva, diversos experimentos visando a transfecção do vetor pMBO131-EBV-M81 em células HEK293 foram realizados sem sucesso durante o mestrado. As dificuldades operacionais foram atribuídas ao elevado tamanho do vetor contendo o genoma viral, o que compromete ou mesmo inviabiliza a transfecção celular baseada em carreadores lipídicos. O vetor pMBO131-EBV-M81 contém todo o genoma do EBV, além de sequências codificadoras de genes de resistência para bactérias e células eucariotas, bem como sequência codificadora de GFP.

Adicionalmente, quando a construção do vetor de gRNA para edição dos miR-BARTs 7 e 9 foi concluída, células Akata-Cas9 apresentaram diminuição de viabilidade quando transduzidas com os construtos gerados. Esse evento foi relacionado à expressão da proteína reporter fluorescente DsRed contida no vetor-base utilizado para produção dos construtos contendo os gRNAs para miR-BARTs 7 e 9. O papel citotóxico de DsRed já havia sido previamente relatado (Zhou et al. 2011). Dessa forma, esses construtos gerados durante o período do mestrado não puderam ser utilizados, sendo necessária a construção de novos vetores para realização a edição gênica do genoma do EBV empregando CRISPR/Cas9.

---



Dados esses percalços, optou-se por alterar o projeto original de modo a se empregar a linhagem Akata-Cas9 para realização da edição gênica para deleção dos miR-BARTs 7 e 9 (procedimentos realizados pelo doutorando Brunno Felipe Ramos Caetano (Caetano 2022)), e posteriormente para produção das partículas virais editadas, as quais foram utilizadas para o estabelecimento do protocolo de infecção de células epiteliais de nasofaringe.

Assim, a seguir serão descritos os procedimentos dos experimentos relacionados à produção dos construtos de gRNAs para deleção dos miR-BARTs 7 e 9.

## 8.2 Construção de vetores de RNAs-guia para edição CRISPR/Cas9

O desenho das sequências gRNA para os miR-BARTs 7 e 9 foi realizado utilizando a plataforma Chop-Chop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) (Labun et al. 2019). Essa ferramenta possibilita produção de sequências de gRNA baseadas em sequências de miRNAs depositadas na base de dados miRBase (<http://www.mirbase.org/>) (Kozomara, Birgaoanu, e Griffiths-Jones 2019) e um genoma de referência, tendo sido utilizado o genoma de EBV das células Akata (NCBI Genbank Acc. #KC207813, "*Human herpesvirus 4 strain Akata, complete genome*"). Dentre as sequências de gRNA obtidas foram selecionadas as que apresentavam parâmetros indicativos de maior efetividade do gRNA. A plataforma utiliza algoritmo que gera pontuação com valor entre 0 e 1 para expressar a eficiência do gRNA (da menor para maior eficiência predita, respectivamente), levando também em consideração o nível de autocomplementaridade do oligonucleotídeo e sua composição, visando proporção equilibrada de nucleotídeos citosina e guanina (Pereira 2016).

A clonagem do gRNA foi planejada para inserção das sequências selecionadas no vetor-base pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr (AddGene Cód. #83919; doravante denominado pLV-gRNA), que propicia expressão dos RNAs-guia dirigida por região promotora U6. A inserção dos gRNAs no cassete de clonagem empregou a enzima de restrição *BsmBI*, de modo que foram adicionadas sequências às extremidades do gRNA para permitir a ligação com as extremidades coesivas do vetor após a digestão enzimática.

Após digestão do vetor pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr com *BsmBI* (New England Biolabs - NEB, Ipswich, MA, EUA), foi efetuado seu tratamento enzimático com fosfatase antártica (NEB) para evitar sua recircularização. Paralelamente foi realizado o anelamento das sequências dos gRNAs de miR-BARTs 7 e 9. Os *duplexes* gRNA-miR-BART7 e gRNA-miR-BART9 foram então submetidos a fosforilação da extremidade 5' utilizando a enzima T4 polinucleotídeo quinase (T4-PNK, NEB). Com o vetor digerido e o

---

as sequências dos gRNAs aneladas e fosforiladas, foi realizada reação de ligação para o gRNA-miR-BART7 e gRNA-miR-BART9 utilizando a enzima T4 DNA ligase (NEB). Foram utilizadas quantidades na proporção 1:3 de vetor/inserto. O Quadro Suplementar 1 indica as condições experimentais desses experimentos.

A verificação da ligação do inserto com o vetor foi verificada por meio de PCR empregando enzima Taq DNA polimerase convencional e condições experimentais indicadas no Quadro Suplementar 2.

**Quadro Suplementar 1:** Discriminação de condições experimentais da clonagem dos vetores pLV-DsRed-gRNA-miR-BART7 e pLV-DsRed-gRNA-miR-BART9

Propósito experimental	Componentes da reação	Condições da reação
Digestão do vetor pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr com a enzima BsmBI	NEB Buffer 3.1, 0,5 U de enzima BsmBI, 500 ng vetor; Água miliQ q.s.p.	Volume: 25µl; Incubação a 55°C por 1 h
Tratamento do vetor pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr digerido com fosfatase antártica	Fosfatase antártica buffer, 5U de enzima fosfatase antártica	Incubação a 37°C por 30 min seguida de inativação a 80°C por 20 min
Anelamento dos oligos gRNA-BART7	60µM de oligonucleotídeos gRNA-BART7 sense e antisense, tampão T4 ligase, Água miliQ q.s.p.	Volume: 20µl; Incubação a 95°C por 10 min seguida de resfriamento gradual até temp. ambiente
Fosforilação duplex gRNA-BART7 com T4 polinucleotídeo quinase (T4 PNK)	1150ng de duplexes gRNA-BART7, tampão T4 PNK, 10mM de ATP, 10U T4 PNK	Volume: 25µl; Incubação a 37°C por 30 min seguida de inativação 65°C por 20 min
Ligação duplex gRNA-BART7 com vetor pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr	Tampão T4 DNA ligase, 50ng vetor, 389,6pg gRNA-BART7, 1U T4 DNA ligase, Água miliQ q.s.p.	Volume 20µl; Incubação a 16°C overnight seguida de inativação a 65°C por 20 min
Anelamento dos oligos gRNA-BART9	60µM de oligonucleotídeos gRNA-BART9 sense e antisense, tampão T4 ligase, Água miliQ q.s.p.	Volume: 20µl; Incubação a 95°C por 10 min seguida de resfriamento gradual até temp. ambiente
Fosforilação duplex gRNA-BART9 com T4 polinucleotídeo quinase (T4 PNK)	520ng de duplexes gRNA-BART9, tampão T4 PNK, 10mM ATP, 10U T4 PNK	Volume: 25µl; Incubação a 37°C por 30 min seguida de inativação 65°C por 20 min
Ligação duplex gRNA-BART9 com vetor pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr	Tampão T4 DNA ligase, 8,2pg vetor, 73,05pg gRNA-BART9, 1U T4 DNA ligase, Água miliQ q.s.p.	Volume 20µl; Incubação a 16°C overnight seguida de

Propósito experimental	Componentes da reação	Condições da reação
		inativação a 65°C por 20 min

**Quadro Suplementar 2:** Condições experimentais de PCR de confirmação de ligação, PCR de colônia e PCR de confirmação de miniprep

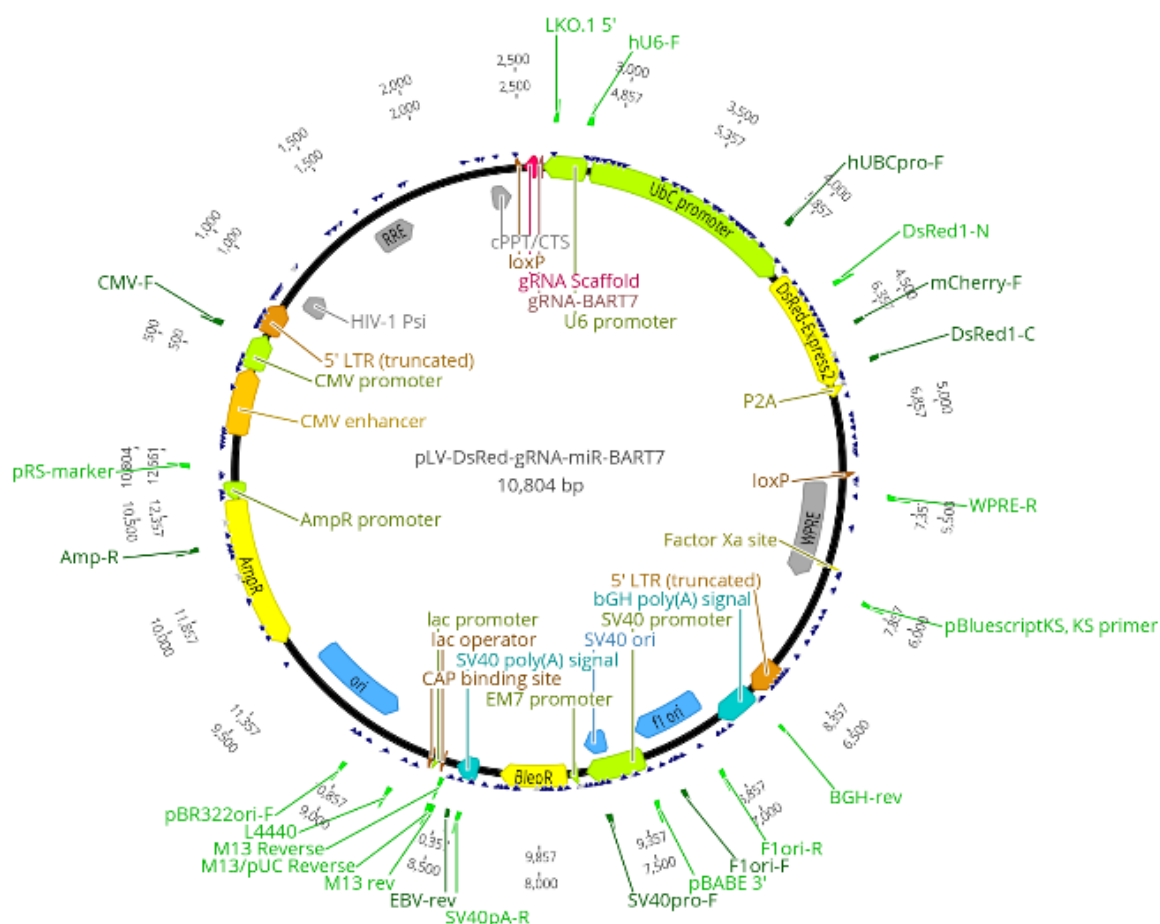
Propósito experimental	Componentes da reação	Condições da reação
<b>PCR confirmação ligação (5' – 3')</b> (20 µL) hU6.F - GAGGGCCTATTTCCCATGATT gSeq.R - AGAAGAAGAAGGTGGAGAGA	10x <i>Class Five</i> Buffer 30mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2mM dNTP, 0,3µM iniciadores, 1,25U <i>Class-Five Taq DNA</i> Polymerase, 4µl Reação de ligação	94°C – 5 min (1x); 94°C – 30s, 55°C – 30s, 72°C – 60s (35x); 72°C – 7 min (1x); 4°C - ∞
<b>PCR de colônia (5' – 3')</b> (20 µL) hU6.F - GAGGGCCTATTTCCCATGATT gSeq.R - AGAAGAAGAAGGTGGAGAGA	10x <i>Class Five</i> Buffer 30mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2mM dNTP, 0,3µM iniciadores, 1,25U <i>Class-Five Taq DNA</i> Polimerase	94°C – 10 min (1x); 94°C – 30s, 55°C – 30s, 72°C – 60s (35x); 72°C – 7 min (1x); 4°C - ∞
<b>PCR confirmação purificação (5' – 3')</b> (20 µL) hU6.F - GAGGGCCTATTTCCCATGATT gSeq.R - AGAAGAAGAAGGTGGAGAGA	10x <i>Class Five</i> Buffer 30mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2mM dNTP, 0,3µM iniciadores, 1,25U <i>Class-Five Taq DNA</i> Polimerase, 1µl Miniprep	94°C – 5 min (1x); 94°C – 30s, 55°C – 30s, 72°C – 60s (35x); 72°C – 7 min (1x); 4°C - ∞

Os produtos da ligação para produção dos vetores pLV-gRNA-miR-BART7 e pLV-gRNA-miR-BART9 foram transformados em bactérias quimicamente competentes *One Shot Stbl3 E. coli* (ThermoFisher), seguindo as orientações do fabricante. Sucintamente, o produto da reação de ligação foi acrescentado ao tubo contendo as bactérias, que posteriormente foi incubado em gelo por 30 min. As bactérias foram então submetidas a choque térmico com incubação a 42°C por 45s e então mantidas em gelo por 2 min. Subsequentemente foi adicionado 500µl de meio S.O.C (meio SOB suplementado com glicose) e incubadas a 37°C, 14xg por 1 h. As bactérias transformadas foram plaqueadas em placas de ágar sólido contendo ampicilina (100µg/ml) e incubadas a 37°C *overnight*. Para confirmar a presença do inserto no vetor, foi realizado um PCR de colônia (*PCR colony*) utilizando os iniciadores hU6.F e gSeq.R, conforme condições experimentais detalhadas no Quadro Suplementar 2.

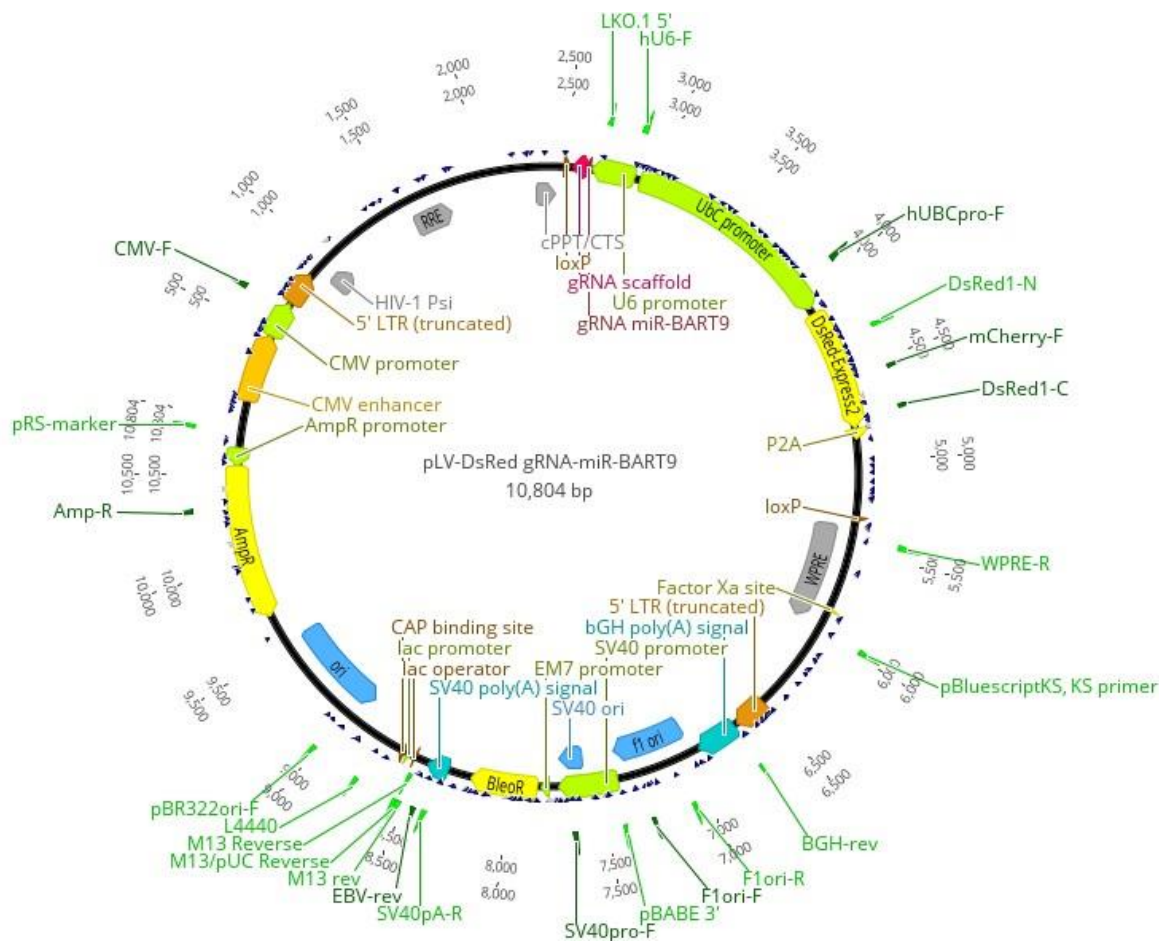
Em seguida, duas colônias foram selecionadas para realização de purificação plasmidial com o sistema *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de

acordo com instruções do fabricante. As concentrações foram determinadas por espectrofotômetro NanoDrop® (ThermoFisher). Para confirmação da presença do inserto nos vetores pLV-gRNA-miR-BART7 e pLV-gRNA-miR-BART9, o DNA proveniente da purificação foi utilizado em nova PCR utilizando os iniciadores hU6.F e gSeq.R (Quadro Suplementar 2).

A confirmação da sequência e orientação do gRNA nos vetores após a clonagem foi efetuada por sequenciamento Sanger efetuado pelo serviço especializado do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UNESP, empregando os iniciadores hU6.F e gSeq.R e equipamento ABI3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências obtidas foram alinhadas com um vetor modelo para pLV-gRNA-miR-BART7 (Figura Suplementar 1) e pLV-gRNA-miR-BART9 (Figura Suplementar 2) construído utilizando o software *Geneious*.



**Figura Suplementar 1:** Mapa do vetor pLV-gRNA-miR-BART7, construído utilizando o software *Geneious*. O mapa contém anotações da sequência dos gRNAs e das estruturas necessárias para sua expressão.



**Figura Suplementar 2:** Mapa do vetor pLV-gRNA-miR-BART9, construído utilizando o software Geneious. O mapa contém anotações da sequência dos gRNAs e das estruturas necessárias para sua expressão.

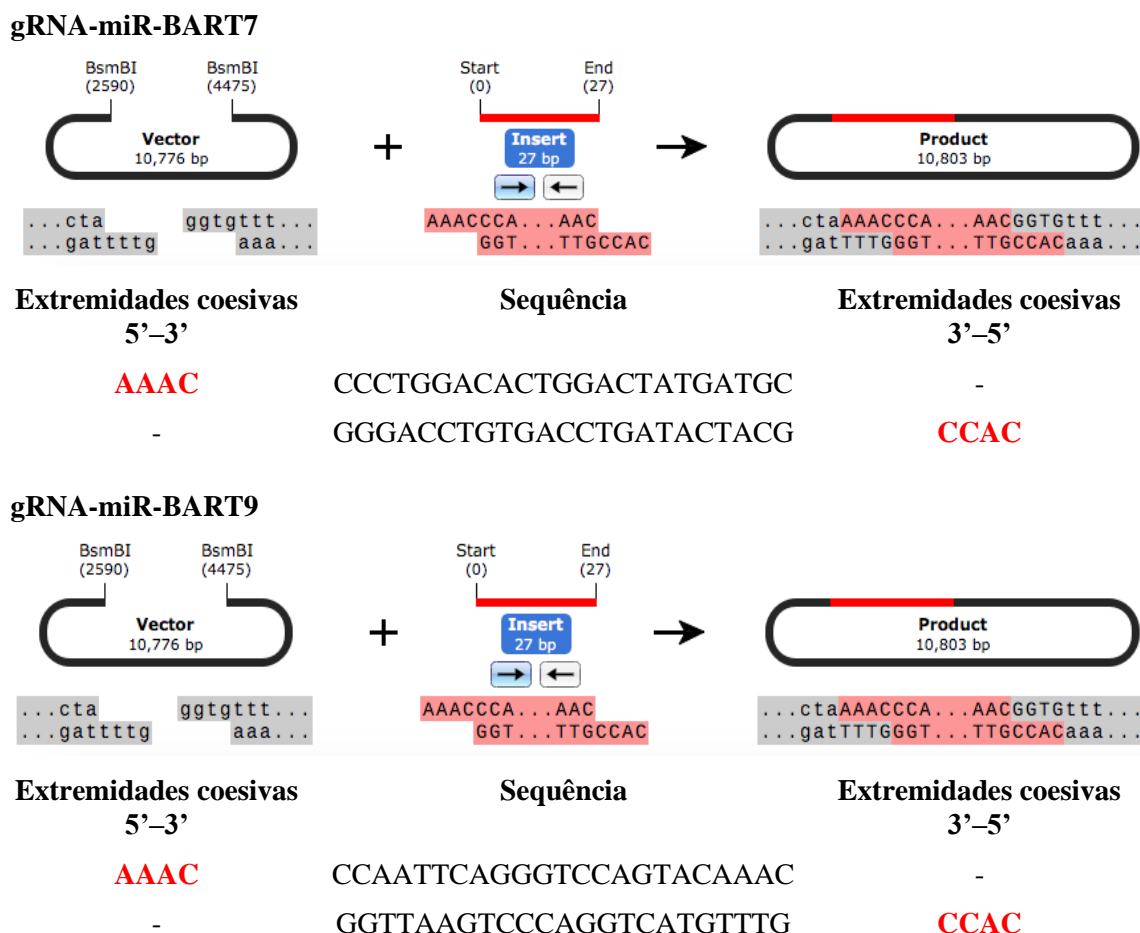
### 8.3 Construtos de gRNA para edição de miR-BARTs 7 e 9

A construção das sequências dos gRNAs foi realizada a partir das sequências dos miR-BARTs 7 ou 9 e do genoma do EBV. Na plataforma Chop-Chop foram obtidas sugestões de sequência de gRNAs para miR-BARTs 7 e 9, representadas no Quadro Suplementar 3. As sequências previstas com maior eficiência de edição (posição 1 no quadro) para miR-BART 7 e miR-BART 9, foram avaliadas quanto a presença de alvos espúrios (*off-targets*) nos genomas do EBV e humano. Essas sequências de maior eficiência prevista de edição foram selecionadas para seguimento do estudo, posto que não foram identificadas interações indesejáveis relevantes.

**Quadro Suplementar 3:** Sequências e escores de gRNAs para *knockout* de miR-BARTs 7 e 9 no genoma do EBV.

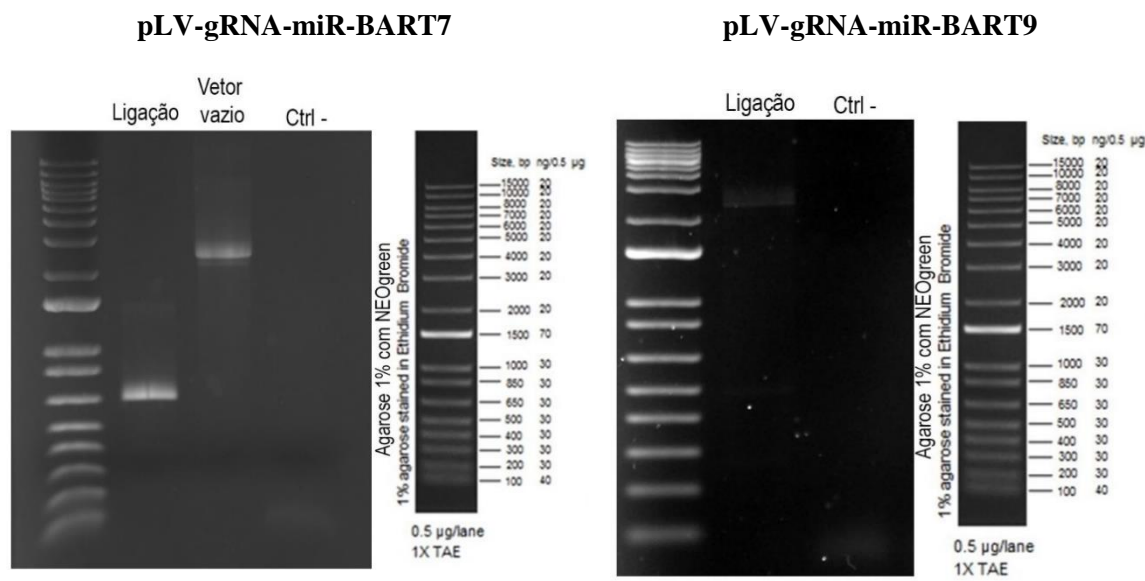
Posição	Sequência	Loci	Exon	Fita	%GC	Auto- Compl.	Eficiência
<b>gRNAs miR-BART7</b>							
1	GCATCATAGTCCAGTGTCCAGGG	seq:50	1	+	50	0	0.59
2	AGTGCACTGTCCCTGGACTGG	seq:60	1	-	60	3.00	0.57
3	TAAGAATTGTTTCATAGTCAAGG	seq:21	1	-	25	1.00	0.54
4	TTGTTTCATAGTCAAGGTCCAGG	seq:15	1	-	40	2.00	0.53
5	CATAGTCAAGGTCCAGGATCAGG	seq:9	1	-	50	1.00	0.50
6	TGCATCATAGTCCAGTGTCCAGG	seq:49	1	+	50	0	0.49
<b>gRNAs miR-BART9</b>							
1	GTTTGTACTGGACCCTGAATTGG	seq:9	1	+	45	1.00	0.47
2	CTGAATTGGAAACAGTAACTTGG	seq:23	1	+	35	0	0.46
3	TGGATTCTGTAACACTTCATGGG	seq:43	1	+	35	0	0.45
4	AAGTACTGTTTCCAATTCAGGG	seq:21	1	-	30	0	0.42
5	TTGGATTCTGTAACACTTCATGG	seq:42	1	+	35	0	0.38
6	CAAGTACTGTTTCCAATTCAGG	seq:22	1	-	35	0	0.37

A adição de sequências das extremidades coesivas da enzima *BsmBI* às extremidades do gRNA foi realizada para possibilitar a clonagem do inserto no vetor pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr. A sequência final está representada na Figura Suplementar 3.



**Figura Suplementar 3:** Ilustração da clonagem dos gRNAs para miR-BART7 e miR-BART9 no vetor pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr. São descritas as sequências dos gRNAs, na coluna central, e as sequências das extremidades coesivas da enzima *BsmBI* que foram adicionadas às sequências dos gRNAs, nas colunas laterais.

Os experimentos de clonagem foram iniciados após a obtenção das sequências de gRNA-BART7 e gRNA-BART9. O anelamento das sequências dos gRNAs para os miR-BARTs 7 e 9, obteve concentração de 115,5 ng/μl e 104 ng/μl, respectivamente, determinada por espectrofotometria UV. Em seguida foram realizadas a fosforilação dos duplexes, digestão do vetor e reação de ligação. A reação de ligação foi validada por PCR, cujo produto foi analisado em gel de agarose 1%. Conforme observado na Figura Suplementar 4, foi identificada uma banda compatível com o tamanho esperado de 643 pb, indicando sucesso na ligação do duplex de gRNA ao vetor.

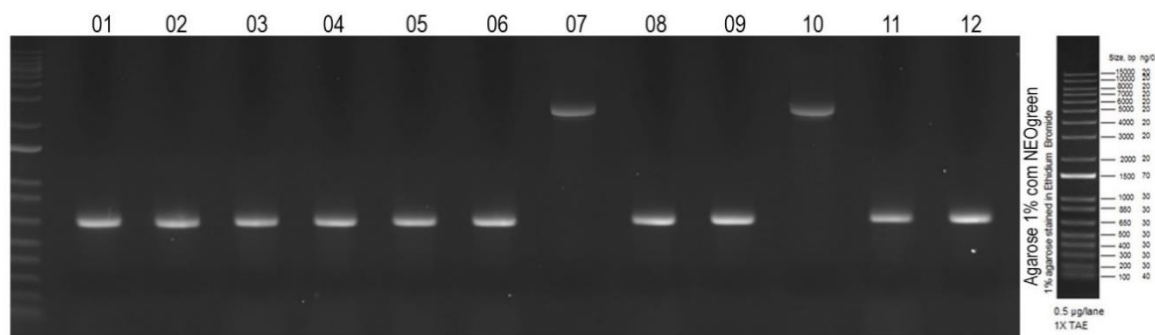


**Figura Suplementar 4:** Gel de agarose 1% contendo o produto da PCR de confirmação da ligação para os vetores pLV-gRNA-miR-BART7 e pLV-gRNA-miR-BART9. O vetor vazio foi utilizado como controle do experimento, para verificar quanto à presença de recircularização do vetor digerido usado na ligação. O produto gerado apresenta 643pb.

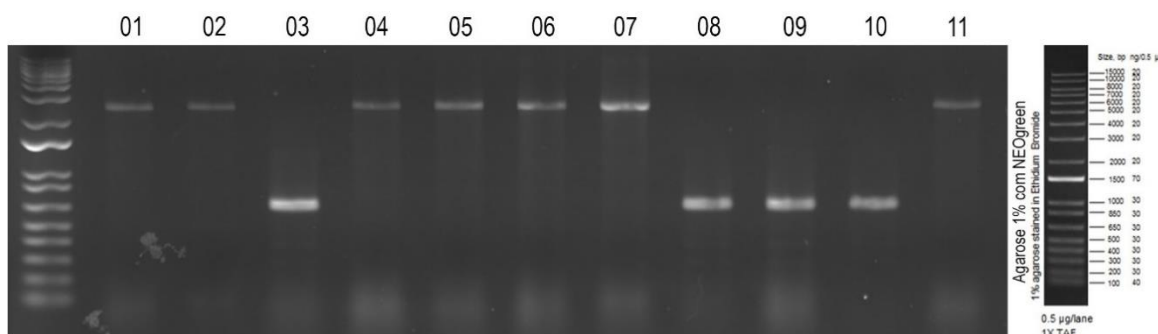
A reação de ligação foi então utilizada na transformação de bactérias quimicamente competentes, seguindo-se PCR de colônia para verificação da presença de vetor com o gRNA-miR-BART7 ou gRNA-miR-BART9 nas bactérias antibiótico-resistentes. Os resultados indicados Figura Suplementar 5 revelam múltiplos clones com resultado compatível a presença dos construtos esperados, tendo sido isolados os clones 9 e 11, de pLV-gRNA-miR-BART7, e os clones 3 e 8, de pLV-gRNA-miR-BART9, para purificação plasmidial. As concentrações e grau de pureza dos plasmídeos obtidos estão indicados no Quadro Suplementar 4.



**pLV-gRNA-miR-BART7**



**pLV-gRNA-miR-BART9**

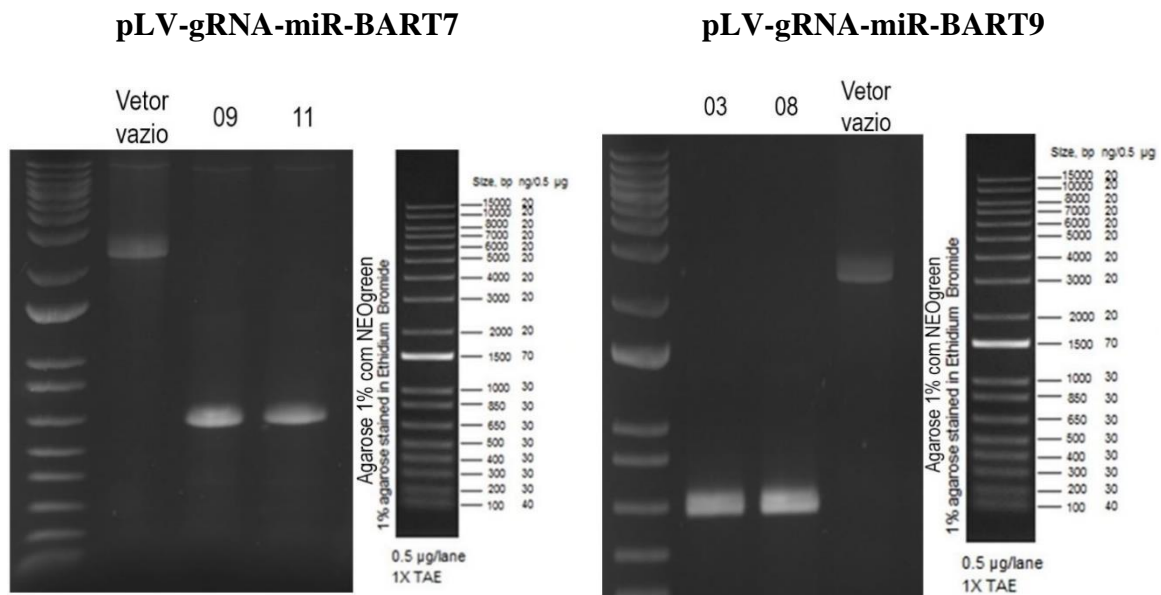


**Figura Suplementar 5:** Gel de agarose 1% contendo o produto do PCR colony. Para cada construto são mostradas colônias bacterianas, sendo as colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11 e 12 positivas para a presença do vetor pLV-gRNA-miR-BART7, e as colônias 3, 8, 9 e 11 positivas para o vetor pLV-gRNA-miR-BART9, devido a banda de aproximadamente 650pb, tamanho próximo ao esperado (643pb).

**Quadro Suplementar 4:** Concentrações e razões de pureza do DNA obtido na extração plasmidial das colônias selecionadas

Construto	Bactérias transformadas	A260/A280	A260/A230	[ ] ng/µL
pLV-gRNA-miR-BART7	Colônia 9	1,93	2,27	238,5
	Colônia 11	1,85	2,23	549,9
pLV-gRNA-miR-BART9	Colônia 3	1,89	2,25	529,5
	Colônia 8	1,89	2,27	339,5

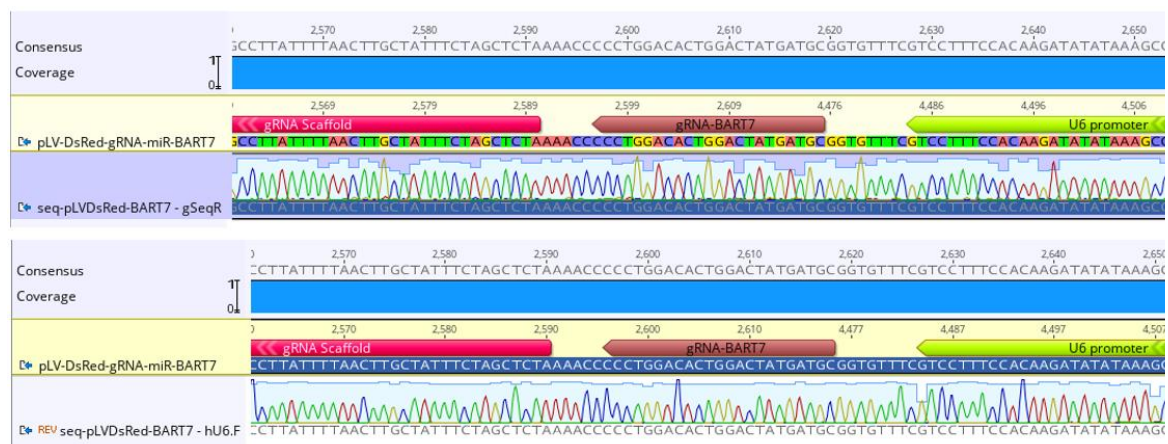
Após purificação plasmidial, foi realizada nova PCR para obtenção de amplicon para sequenciamento Sanger. O resultado da PCR (Figura Suplementar 6) revelou tamanho compatível com esperado para presença do inserto nos construtos pLV-gRNA-miR-BART7 e pLV-gRNA-miR-BART9 (643pb).



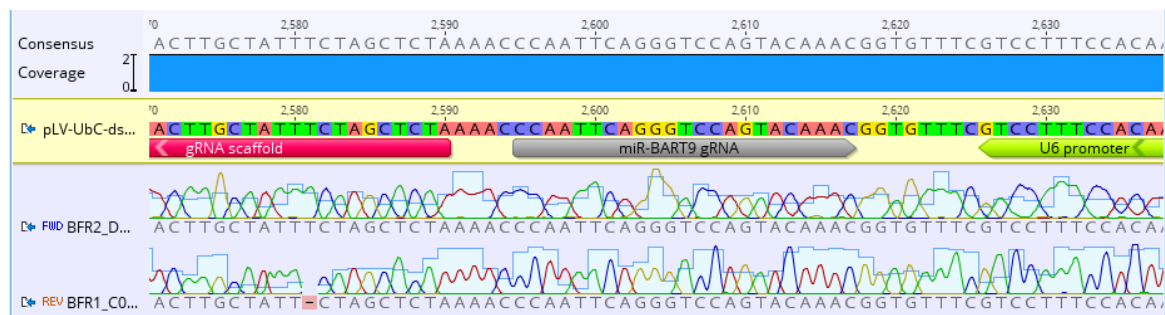
**Figura Suplementar 6:** Gel de agarose 1% contendo o produto da PCR de confirmação de purificação plasmidial dos construtos pLV-gRNA-miR-BART7 e pLV-gRNA-miR-BART9. As bandas apresentam tamanho aproximado de 650pb, tamanho similar ao amplicon gerado (643pb).

Para validação da clonagem, os vetores construídos foram submetidos a sequenciamento. O alinhamento mostrou a presença das sequências e orientação corretas de ambos gRNAs em seus respectivos construtos, pLV-gRNA-miR-BART7 e pLV-gRNA-miR-BART9, como mostrado na Figura Suplementar 7.

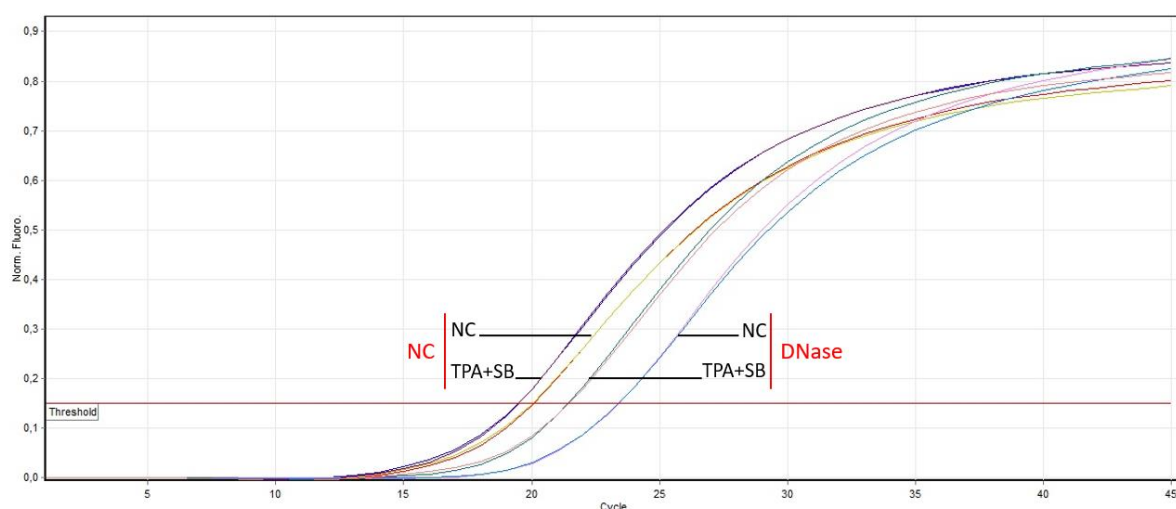
#### pLV-gRNA-miR-BART7



**Figura Suplementar 7:** Eletroferogramas do sequenciamento dos amplicons gerados por PCR com os iniciadores gSeq.R e hU6.F e alinhamentos empregando como referência os construtos planejados pLV-DsRed-gRNA-BART7 e pLV-DsRed-gRNA-BART9. Estão evidenciadas a presença da sequência integral e a orientação correta de inserção dos gRNAs para edição de miR-BARTs 7 e 9 no vetor-base pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr, resultado que valida geração dos respectivos construtos lentivirais.

**pLV-gRNA-miR-BART9****Figura Suplementar 7 (Continuação).**

#### 8.4 Avaliação do tratamento de sobrenadante viral com DNase



**Figura Suplementar 8:** Curva de amplificação linear do gene BGLF5 do EBV por qPCR utilizando amostras de sobrenadante celular de células Akata-Cas9 tratado com DNase (DNase) e controle negativo (NC) (legendas em vermelho), verificando a presença de DNA viral livre no sobrenadante celular após indução de ciclo lítico (TPA+SB) e controle negativo (NC) (legendas em preto).

## 8.5 Recursos de pesquisa

### Quadro Suplementar 5: Recursos e reagentes

Recurso	Fonte	Ref.
Akata-Cas9	Dept. Infectious Diseases, Harvard University	RRID: CVCL_VN88
Anti-IgG humano	Merck/Sigma-Aldrich	I5260
Blasticidina (10 mg/mL)	Thermo Fisher Scientific	A1113903
BsmBI	New England Biolabs	R0580
Class Five Taq DNA Polimerase	NeoBio	CV-1015
Defined Keratinocyte SFM (1x)	Thermo Fisher Scientific	10744019
DMSO	Thermo Fisher Scientific	20688
DNase I	Sigma-Aldrich	AMPD1-1KT
EBV (B95-8 strain) purified Virus	Advanced Biotechnologies Inc	10-115-000
EpiLife medium, with 60	Thermo Fisher Scientific	MEPI500CA
Fosfatase antártica	New England Biolabs	M0289S
Geneious Sofyware	Biomatters	
GenePrint® 10 System	Promega	B9510
Geneticina	Thermo Fisher Scientific	10131035
Gentamicina	Thermo Fisher Scientific	15710064
GoTaq qPCR Master mix	Promega	A6001
High Capacity cDNA Reverse Transcription kit	Thermo Fisher Scientific	4368814
Keratinocyte SFM (1x)	Thermo Fisher Scientific	17005042
LB agar, powder	Thermo Fisher Scientific	22700041
Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base), powder	Thermo Fisher Scientific	12795084
MTT	Thermo Fisher Scientific	M6494
NP460hTert	Hong Kong University, China	RRID: CVCL_X205
NP69SV40t	Cornell University, NYC	RRID: CVCL_F755
One Shot Stbl3 E. coli	Thermo Fisher Scientific	C7373-03
pLV-U6-gRNA-Ubc-DsRed-P2a-Bsr	AddGene	83919
Polybrene	Sigma-Aldrich	H9268
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific	25530015
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	27106
RPMI 1640 medium	Thermo Fisher Scientific	31800105
SB	Sigma-Aldrich	B5887
Soro fetal bovino	Sigma-Aldrich	F7524
T4 DNA ligase	New England Biolabs	M0202S
T4-PNK	New England Biolabs	M0201S
TPA	Sigma-Aldrich	P1585
TRIzol	Thermo Fisher Scientific	15596026
Wizard SV Genomic DNA Purification System	Promega	A2360

**Quadro Suplementar 6: Iniciadores**

<b>Nome</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>
<b>EBV gene BZLF1 (proteína ZEBRA)</b>	S: TACAAGAATCGGGTGGCTTC AS: GCACATCTGCTTCAACAGAA
<b>EBV gene BLLF1 (proteína gp350)</b>	S: TGTTACAGTGACTGCCTTTTGGG AS: GGTGTCCCCGAGGTGAGAGT
<b>Gene Humano RPS18 (proteína 40S)</b>	S: AGAAACGGCTACCACATCCA AS: CACCAGACTTGCCCTCCA
<b>EBV gene BGLF5 (proteína bgf5)</b>	S: CCTCTTTTCCAAGTCAGAATTTGA AS: TGACCTCTTGCATGGCCTCT
<b>SNP humano rs1800630 (pTNF-<math>\alpha</math> -862)</b>	S: ATGTAGCGGCTCTGAGGAATGGGTTAC AS: CTACATGGCCCTGTCTTCGTTAAG
<b>Iniciador para vetor pLV-gRNA - hU6.S</b>	GAGGGCCTATTTCCCATGATT
<b>Iniciador para vetor pLV-gRNA - gSeq.R</b>	AGAAGAAGAAGGTGGAGAGA