



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

“Análise proteômica de células humanas *in vitro* expressando a oncoproteína LMP1 do vírus de Epstein-Barr (EBV)”

CÉSAR AUGUSTO GANDIN

Acadêmico

Dissertação de mestrado no programa de PG em Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB). Trabalho desenvolvido no Departamento de Física e Biofísica e Farmacologia do IBB e grupo [ViriCan](#), lotado no Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UNESP.

Botucatu, SP

Julho de 2022



unesp

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

**“Análise proteômica de células humanas *in vitro* expressando
a oncoproteína LMP1 do vírus de Epstein-Barr (EBV)”**

CÉSAR AUGUSTO GANDIN

Acadêmico

MÁRIO DE OLIVEIRA NETO, PHD

Orientador

DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA, PHD

Co-orientador

Botucatu, SP

Julho de 2022

Gandin, César Augusto.

Análise proteômica de células humanas *in vitro* expressando a oncoproteína LMP1 do vírus de Epstein-Barr (EBV) / César Augusto Gandin. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Mario de Oliveira Neto

Coorientador: Deilson Elgui de Oliveira

Capes: 90400003

1. Espectrometria de massa. 2. Herpesvirus humano 4. 3. Fator 2 Associado a Receptor de TNF. 4. Neoplasias Nasofaríngeas.

Palavras-chave: Carcinoma de nasofaringe; Epstein-Barr Virus; Espectrometria de massa; LMP1.

“Análise proteômica de células humanas *in vitro* expressando a oncoproteína LMP1 do vírus de Epstein-Barr (EBV)”

Sumário

1	Introdução	12
1.1	Espectrometria de Massa	12
1.1.1	Preâmbulo	12
1.1.2	Fundamentos do método.	13
1.2	Cânceres e infecção pelo vírus de Epstein-Barr.....	26
1.2.1	Cânceres: generalidades.....	26
1.2.2	Biologia e carcinogenicidade do EBV.....	28
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo geral.....	36
2.2	Objetivos específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Células empregadas e Cultivo Celular.....	39
3.2	Vetores para expressão constitutiva de EBV LMP1.....	39
3.3	Preparação dos vetores e transfecção celular.....	40
3.4	Extração de RNA total e análise da expressão de LMP1 em nível transcricional.....	41
3.5	Extração e quantificação de proteínas totais	41
3.6	Identificação de proteínas por MS.....	42
3.6.1	Digestão Enzimática das proteínas presentes nas amostras em solução	42
3.6.2	Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas e identificação das proteínas presentes nas amostras.....	42
4	RESULTADOS	44

4.1	Preparo dos vetores e transfecção celular	44
4.2	Detecção da expressão de EBV LMP1.....	45
4.3	Identificação peptídica por Espectrometria de Massas	47
5	Discussão	53
6	Conclusões.....	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8	Anexos	65

Lista de Figuras

Figura 1 – Exemplo de um espectro de massas, reproduzido de (GROSS, 2011).	13
Figura 2 – Representação esquemática dos principais analisadores de massa. A - Analisador por tempo de voo: íons são gerados em um mesmo instante e “apostam corrida” até o detector. Retirado de CORNISH; BRYDEN, 1999. B – Filtro de massas quadrupolo: Íons viajam perpendicularmente ao campo elétrico bidimensional gerado pelos eletrodos. Apenas íons de determinada razão m/z atingem o detector. Retirado de HONOUR, 2003. C – Armadilha de íon quadrupolo: Íons de determinada razão m/z são aprisionados em um campo elétrico tridimensional gerado no interior do eletrodo e então ejetados em direção ao detector. Retirado de KICMAN; PARKIN; ILES, 2007.	16
Figura 3 – (A) Representação esquemática dos eletrodos cilíndricos e potenciais aplicados aos mesmos. Retirado de (March, 2009) (MARCH, 2009). (B) Equações (15) e (16) representam as seções transversais das superfícies hiperbólicas dos eletrodos. Gerado pela ferramenta online WolframAlpha (wolframalpha.com).	21
Figura 4 – Número de desfechos fatais de cânceres relacionados à Infecção pelo EBV no período de 1990-2010. Figura adaptada de Kahn e Hashim (2014) (KHAN; HASHIM, 2014)	29
Figura 5 – Estrutura e ativação de diversas vias de sinalização pela LMP1 promovem a sobrevivência celular, proliferação, angiogênese, metástase e a indução da produção de citocinas. Retirado de LO et al., 2021.....	33
Figura 6 – Delineamento geral do estudo.....	38
Figura 7 – Mapa dos construtos utilizados para a expressão constitutiva de LMP1. Adaptado de COAN, 2016.....	40
Figura 8 – Gel de eletroforese do produto de PCR realizada para verificação da presença da ORF da sequência viral codificadora de LMP1 nos construtos: Zs-B95.8 - ZsGreen-LMP1-B958; Zs-M81 - ZsGreen-LMP1-M81; Zs-Base - pEF1 α -IRES-ZsGreen. M – Marcador de número de pares de base.	44
Figura 9 – Expressão da GFP 24h após a transfecção celular em células HEK293.....	45

Figura 10 – Gel de eletroforese do produto de PCR realizada para verificação da presença do mRNA da LMP1 nas amostras transfectadas: HEK-B958 - Células HEK293 transfectadas com o vetor ZsGreen-LMP1-B958; HEK-ZsGreen - Células HEK293 transfectadas com o vetor-base pEF1 α -IRES-ZsGreen. Zs-B95.8 – Reação de amplificação do vetor ZsGreen-LMP1-B958. M – Marcador de número de pares de base. A redução do tamanho do amplicon comparando as amostras de cDNA e DNA evidenciam a expressão do mRNA da LMP1. Imagem com efeito negativo.	46
Figura 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas totais extraídas de células HEK293 transfectadas com o vetor-base (C-) ou com vetor para expressão da proteína LMP1 do EBV, variante B95.8. M – Marcador de peso molecular.	47
Figura 12 – Diagrama de Venn indicando a quantidade total de proteínas identificadas por MS em cada condição experimental e as compartilhadas entre as amostras avaliadas.	48
Figura 13 – Análises funcionais das proteínas identificadas por MS em apenas um dos grupos de estudo. Gráficos da esquerda referem-se as proteínas identificadas na presença de EBV LMP1-B95.8. Gráficos da direita referem-se as proteínas detectadas apenas no controle negativo. A – Proteínas classificadas de acordo com a sua função molecular. B – Proteínas classificadas de acordo com os processos biológicos nos quais estão envolvidas. C – Proteínas classificadas de acordo com a sua classe. Nota-se a similaridade entre os perfis.	49
Figura 14 – Gráfico de vulcão (<i>Volcano Plot</i>) indicando as proteínas expressas diferencialmente em células expressando EBV LMP1 em relação ao vetor base. Células coletadas para extração de proteínas 72h após transfecção com os vetores ZsGreen-LMP1-B958 e pEF1 α -IRES-ZsGreen. Pontos vermelhos representam as proteínas positivamente reguladas e azuis as proteínas negativamente reguladas. Pontos cinzas não são estatisticamente significativos. Quanto mais longe da posição do (0,0), mais significativo é o resultado.	51
Figura 15 – Mapa de calor demonstrando a análise de agrupamentos para as proteínas diferencialmente expressas na presença de LMP1. Proteínas identificadas pelo Código UniProt (UniProt). Os códigos destacados referem-se a duas das proteínas selecionadas e descritas no quadro 2.	52

Lista de Abreviações

Abreviação	Definição por extenso	Definição em inglês
Arp	Proteínas relacionadas a actina	<i>Actin Related Protein</i>
BARTs	Transcritos gerados a partir de porção à direita do segmento BamHI-A do genoma viral	<i>BamHI-A rightward transcripts</i>
BL	linfoma de Burkitt	<i>Burkitt Lymphoma</i>
CDK1	Quinase 1 dependente de ciclina	<i>Cyclin-Dependent kinase 1</i>
CSF-1	Fator estimulador de colônias 1	<i>Colony-stimulating fator 1</i>
CTAR	Região C-terminal de ativação 1	<i>Carboxyl-Terminal Activation Region</i>
EBERs	Pequenos RNAs codificados pelo EBV	<i>Esptein-Barr 8anam-encoded small RNAs</i>
EBNA1	Proteína do antígeno nuclear 1	<i>Esptein-Barr Nuclear Antigen-1</i>
EBV	Vírus de Epstein-Barr	<i>Epstein-Barr Virus</i>
ESI	Ionização por pulverização de elétrons por gotículas, também denominado de “eletrospray”	<i>Electrospray Ionization</i>
FC	Expressão diferencial	<i>Fold Change</i>
GAC	Adenocarcinoma gástrico	<i>Gastric Adenocarcinoma</i>
HBV	Vírus da hepatites B	<i>Hepatitis B vírus</i>
HCV	Vírus da hepatites C	<i>Hepatitis C vírus</i>
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HL	Linfoma de Hodgkin	<i>Hodgkin Lymphoma</i>
HPV	Vírus do papiloma humano	<i>Human Papillomavirus</i>
IRF5	Fator regulador de interferon 5	<i>Interferon Regulatory Factor</i>

IRS4	Substrato do receptor de insulina 4	<i>insulin Receptor Substrate 4</i>
JAK3	Janus Quinase 3	<i>Janus Kinase 3</i>
KSHV	Vírus associado ao sarcoma de Kaposi	<i>Kaposi sarcoma-associated herpesvirus</i>
LC	Cromatografia Líquida	<i>Liquid Chromatography</i>
LMP	Proteínas latente de membrana 1	<i>Latent Membrane Proteins</i>
MALDI	Dessorção-ionização de laser em matriz	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization</i>
MS	Espectrometria de massa	<i>Mass Spectrometry</i>
NNKTL	Linfoma Nasal de Células T/Natural Killer	<i>Nasal natural killer/T-cell lymphoma</i>
NPC	Carcinomas de nasofaringe	<i>Nasopharyngeal Carcinoma</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase	<i>Polymerase chain reaction</i>
PTLD	Doença linfoproliferativa pós-transplante	<i>Pos-Transplant Lymphoproliferative Disease</i>
QIT	Aprisionamento de íons em potencial quadrupolar	<i>Quadrupole Ion Trap</i>
QMF	Filtro de massas quadrupolo	<i>Quadrupole mass filter</i>
RIP	Proteína de ligação ao receptor	<i>Receptor Interacting Protein</i>
TNFAIP3	Proteína 3 Induzida por Fator de Necrose Tumoral alfa	<i>Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3</i>
TOF	Tempo de voo	<i>Time of Flight</i>
TRADD	Proteína de Domínio de Morte Associada a Receptor de Fator de Necrose Tumoral 1	<i>Tumor necrose factor Receptor-Associated factor 1 - associated death domain protein</i>
TRAFs	Fatores de necrose tumoral	<i>TNF Receptor-Associated Factors</i>

Resumo

A espectrometria de massas (MS) apresenta um grande potencial para a análise de sistemas biológicos complexos. O desenvolvimento de novas tecnologias de ionização e detectores, transformaram a MS na robusta técnica que é hoje, podendo ser utilizada na detecção de biomarcadores, bem como fazer análises de dinâmicas temporais em diferentes contextos biológicos, inclusive em cenários que envolvem infecção e câncer. O termo câncer engloba centenas de doenças que apresentam diversas características epidemiológicas, biológicas e clínicas que envolvem o comprometimento de mecanismos homeostáticos, fundamentalmente expresso por exacerbação das taxas de proliferação celular e redução das taxas de morte celular. Variados são os fatores etiológicos da doença, destacando-se hábitos alimentares, tabagismo, além de um componente infeccioso. A infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) é digna de destaque devido à sua virtual onipresença e elevado potencial oncogênico. O EBV é um oncovírus que infecta mais de 90% da população mundial adulta e foi primeiramente identificado em células malignas de Linfoma de Burkitt. A infecção pelo vírus é atualmente associada a diversas neoplasias e a expressão de diversos produtos virais vêm sendo relacionada a seu potencial oncogênico. Nesse contexto, a proteína viral LMP1 vem sendo descrita como um dos principais fatores responsáveis por essa característica do EBV, pois confere um alto potencial tumorigênico às células que as expressam. Neste trabalho, células humanas HEK293 foram transientemente transfectadas para a expressão de LMP1 e após 72h as proteínas totais foram sequenciadas e quantificadas por MS. Análises de expressão diferencial revelaram 129 proteínas diferencialmente expressas na presença de LMP1, sendo 90 com *Fold Change* > 2. Análises funcionais das proteínas detectadas revelaram potenciais mecanismos de interação da LMP1 com a célula hospedeira mediante regulação positiva das proteínas rac1, p53, CDK1, ITGB1 e Arp2. A desregulação de tais proteínas podem ser fatores relevantes no processo de tumorigênese deflagrado pelo EBV.

Abstract

Mass spectrometry (MS) has great potential for the analysis of complex biological systems. The development of new ionization technologies and detectors have transformed MS into the robust technique it is today, and can be used in the detection of biomarkers, as well to perform analysis of temporal dynamics in different biological contexts, including in scenarios involving infection and cancer. The term cancer encompasses hundreds of diseases that present various epidemiological, biological and clinical characteristics involving the impairment of homeostatic mechanisms, fundamentally expressed by exacerbation of cell proliferation rates and reduction of cell death rates. There are several etiological factors of the disease, especially eating habits, smoking, in addition to an infectious component. Epstein-Barr virus (EBV) infection is noteworthy due to its virtual omnipresence and high oncogenic potential. EBV is an oncovirus that infects more than 90% of the adult world population and has been first identified in burkitt lymphoma malignant cells. Virus infection is currently associated with several neoplasms and the expression of several viral products has been related to its oncogenic potential. In this context, the viral protein LMP1 has been described as one of the main factors responsible for the oncogenic potential of EBV because it confers a high tumorigenic potential to cells expressing the protein. In this work, human cells HEK293 were transitively transfected for the expression of LMP1 and after 72h total proteins were sequenced and quantified by MS. Differential expression analysis revealed 129 differentially expressed proteins in the presence of LMP1, 90 with Fold Change > 2. Functional analyses of the detected proteins revealed potential mechanisms of interaction of LMP1 with the host cell by positive regulation of rac1, p53, CDK1, ITGB1 and Arp2 proteins. The deregulation of these proteins may be relevant factors in the tumorigenesis process triggered by EBV.

1 Introdução

1.1 Espectrometria de Massa

1.1.1 *Preâmbulo*

A espectrometria de massa (*Mass Spectrometry* – MS) é uma ferramenta analítica robusta e aplicável a uma ampla gama de linhas de pesquisa que necessitam de análises proteômicas. Por exemplo, é empregada com sucesso para a identificação de potenciais alvos moleculares no desenvolvimento de fármacos, análises de toxicidade e – particularmente no caso da espectrometria de massa de troca de hidrogênio-deutério – para o mapeamento de epítomos (MASSON; JENKINS; BURKE, 2017). Ainda, avanços importantes em diversos campos do conhecimento biomédico têm sido possíveis pela quantificação de proteínas com base em tecnologias de marcação com isótopos e análises de massas, impactando positivamente as áreas de pesquisa sobre sinalização celular (ARABI et al., 2012), células tronco, reprogramação celular (BENEVENTO et al., 2014) e cânceres (BANTSCHIEFF et al., 2011).

Análises proteômicas temporais são empregadas para a resolução de problemas complexos e têm ajudado a elucidar a dinâmica de processos biológicos importantes pela discriminação de mudanças no perfil global de expressão proteica e caracterização de transições entre estágios celulares. Esse é o caso da investigação de aspectos de biologia viral, como a transição entre os ciclos latente e lítico do vírus da Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus* – EBV) (ERSING et al., 2017), patógeno associado ao desenvolvimento de diversos cânceres em humanos (MURATA et al., 2021). Mais recentemente, com o surgimento da pandemia de covid-19, a MS foi utilizada para analisar a influência do estado de glicosilação do receptor ACE2 na interação com proteína SPIKE do SARS-CoV-2, crucial no processo de infecção das células humanas pelo novo coronavírus (ALLEN et al., 2020).

Além de sua vasta aplicabilidade para a pesquisa biomédica, a MS tem se tornado popular por sua boa sensibilidade analítica e por ser relativamente rápida na produção de dados. Por outro lado, o método ganhou contornos de “caixa preta” (GLISH; VACHET, 2003) pelo crescente repertório de diferentes equipamentos disponíveis e aumento do número de usuários sem compreensão sobre seus fundamentos teóricos. Visando

esclarecer esses fundamentos, a seguir abordaremos os princípios básicos de funcionamento de um espectrômetro de massa, suas principais fontes de ionização e seus analisadores de massa. Em seguida, serão sucintamente discutidos os princípios físicos e matemáticos de aparelhos do tipo *Quadrupole Ion Trap* (QIT).

1.1.2 Fundamentos do método.

Embora amplamente utilizado, a rigor o termo “Espectrometria de Massa” é cientificamente equivocado. A propriedade física do analito medida em um espectrômetro de massas não é sua massa, mas sim a razão carga/massa (m/z) de uma molécula ou peptídeo ionizado. Um espectro de massas é representado em um gráfico de intensidade pela razão m/z (Figura 1 – Exemplo de um espectro de massas, reproduzido de (GROSS, 2011) Figura 1) (GROSS, 2011). Cada pico se refere a uma determinada razão, enquanto a intensidade está relacionada a quantidade de íons para aquele valor de m/z , podendo ser utilizado para a quantificação relativa dos componentes da amostra. Sendo assim, a amostra a ser analisada deve ser previamente ionizada para posterior análise no espectrômetro, sendo que os dados são coletados a partir da análise de íons na fase gasosa. Dessa maneira, três componentes são essenciais em um experimento de MS: 1) a Fonte de ionização; 2) o analisador de massa; e 3) o detector (GLISH; VACHET, 2003), sumarizados a seguir.

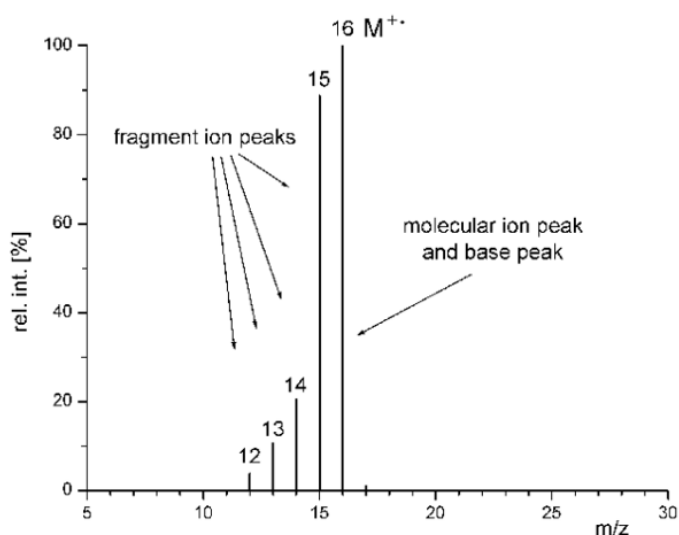


Figura 1 – Exemplo de um espectro de massas, reproduzido de (GROSS, 2011).

Fontes de ionização

A aplicabilidade de MS para o estudo de biomoléculas foi inicialmente limitada pela dificuldade em se ionizar moléculas de grande peso molecular e altas polaridades (GLISH; VACHET, 2003). A atual robustez da MS decorre do desenvolvimento de novas fontes de ionização e de novos analisadores. As duas principais fontes de ionização comumente utilizadas em laboratórios são a ionização por pulverização de elétrons por gotículas, também denominado de “eletrospray” (*Electrospray Ionization* – ESI) (DOLE et al., 1968), e a dessorção-ionização de laser em matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization* – MALDI) (KARAS; BACHMANN; HILLENKAMP, 1985).

Na ESI, a amostra atravessa um fino capilar que está submetido a uma diferença de potencial elétrico, tipicamente 500V a 4500V. A pulverização eletrostática resulta em um jato líquido de gotículas carregadas formadas pelo analito e pelo solvente. Eventualmente os íons ficam livres do solvente para serem analisados pelo espectrômetro. Dois modelos foram propostos para esse fenômeno: o modelo da evaporação dos íons e o modelo de resíduo de carga (WILM, 2011). A ESI tipicamente gera íons mediante protonação/deprotonação da amostra, de modo que uma proteína analisada apresentará uma série de picos adjacentes.

Embora essa múltipla ionização na ESI pode parecer complicar a obtenção da massa da proteína neutra, a massa (M_0) pode ser calculada considerando que dois picos adjacentes diferem por apenas uma unidade de carga atômica e:

- a) Dois picos adjacentes possuem $(m/z)_1$ e $(m/z)_2$;
- b) $(M_0 + z_1)/z_1 = (m/z)_1$ e $(M_0 + z_2)/z_2 = (m/z)_2$, M_0 é a massa da proteína e z é o número de cargas de cada um dos picos;
- c) $z_1 = z_2 + 1$, posto que os picos diferem apenas por um próton.

Consequentemente, a determinação de M_0 será possível baseada em três equações e três incógnitas. Ademais, uma medida mais precisa é possível pela repetição do processo para picos adjacentes via *software*.

Por outro lado, as múltiplas ionizações permitem a análise de grandes complexos por espectrômetros mais simples que não possuem alcance para medir altos valores de m/z . As múltiplas ionizações (maior valor de “z”) resultam em uma menor razão m/z , possibilitando a sua detecção. Além disso, a ESI se tornou uma indispensável estratégia de ionização em experimentos de MS por ser compatível com diferentes técnicas de separação, como as cromatografias líquida e gasosa (GLISH; VACHET, 2003). Associado ao fato da ESI ser capaz de ionizar grandes complexos proteicos mantendo-os intactos, a cromatografia líquida combinada com espectrometria de massas (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry* – LC-MS) tornou-se uma poderosa ferramenta para a elucidação de complexos moleculares biológicos (HALE; COOPER, 2020).

Por sua vez, MALDI é uma técnica que utiliza a energia irradiada por um laser para ionizar macromoléculas. Karas e colaboradores (1985) descobriram que o aminoácido alanina poderia ser ionizado na presença de triptofano quando ambos são irradiados com um laser de comprimento de onda de 266 nm, absorvido pelo aminoácido triptofano. Assim, peptídeos relativamente pequenos (< 3 kDa) puderam ser ionizados utilizando o triptofano como “matriz”. Diferentes combinações de matrizes orgânicas e diferentes comprimentos de ondas de absorção pelas matrizes foram mais tarde empregados para ionização de peptídeos com massas muito maiores (KARAS; HILLENKAMP, 1988; TANAKA et al., 1988).

Ao contrário do que ocorre na ESI, na MALDI são frequentemente formados íons exclusivamente protonados. Assim, acoplando a fonte de ionização a um espectrômetro de tempo de voo (*Time of Flight* – TOF) pode-se rapidamente determinar informações da massa molecular de um analito. Por outro lado, a presença de uma matriz orgânica gera um elevado ruído para razões m/z menores que 500 Da, dificultando a análise de moléculas de baixo peso molecular (GLISH; VACHET, 2003).

Analísadores de massa: TOF, QMS e QIT

Para analisarmos as razões m/z , devemos definir duas propriedades que não estão necessariamente associadas: a precisão e a resolução das medidas. Enquanto a precisão de uma medida se refere a quão próximo o valor de massa obtido experimentalmente é próximo do valor real (GLISH; VACHET, 2003), a resolução de um equipamento de espectrometria de massas é dada por sua capacidade de resolver picos

adjacentes. Matematicamente, a resolução é dada pela razão $m/\Delta m$, onde m é um número inteiro e representa a massa do pico sendo analisado e Δm é a diferença de massa entre dois picos adjacentes.

Cada tipo de espectrômetro determina as massas utilizando métodos distintos. Os equipamentos mais utilizados atualmente são o de tempo de voo (TOF), o filtro de massas quadrupolo (*Quadrupole mass filter* – QMF) e a armadilha de íons quadrupolo (*Quadrupole ion trap* – QIT). TOF é principalmente utilizado acoplados a fontes MALDI, enquanto QMF e QIT são comumente utilizados com fontes ESI em experimentos de LC-MS ou GC-MS (*Giiquid Chromatography Mass Spectrometry* – GC-MS). A **Figura 2** mostra esquematicamente os três principais analisadores de massa.

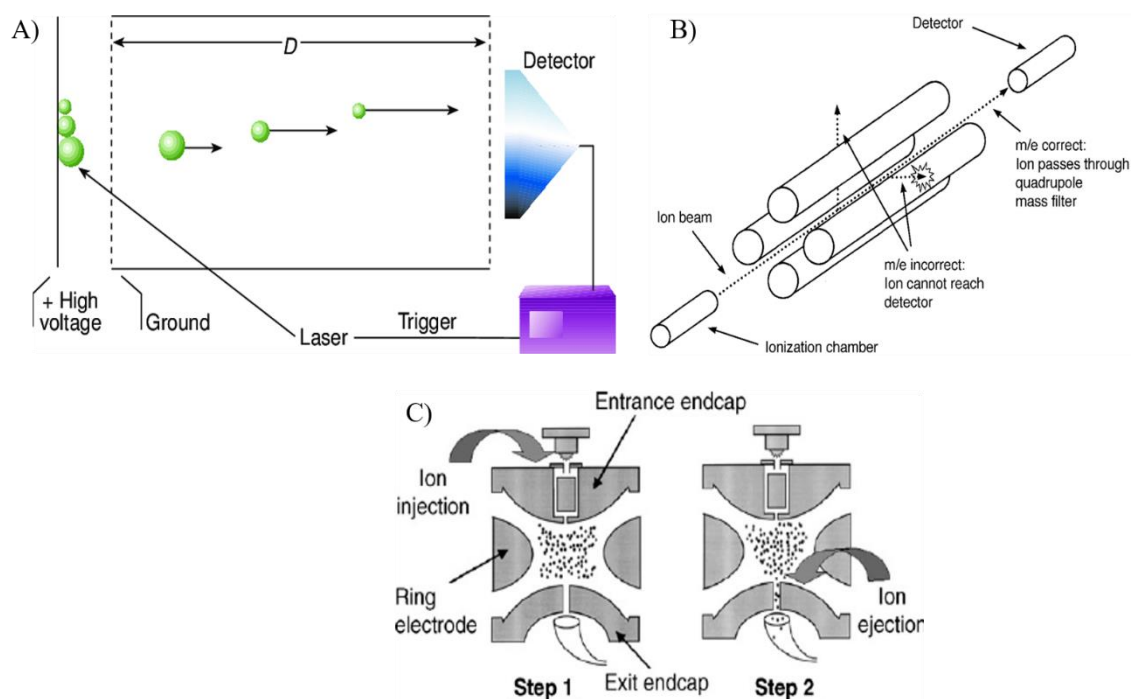


Figura 2 – Representação esquemática dos principais analisadores de massa. A - Analisador por tempo de voo: íons são gerados em um mesmo instante e “apostam corrida” até o detector. Retirado de CORNISH; BRYDEN, 1999. B – Filtro de massas quadrupolo: Íons viajam perpendicularmente ao campo elétrico bidimensional gerado pelos eletrodos. Apenas íons de determinada razão m/z atingem o detector. Retirado de HONOUR, 2003. C – Armadilha de íon quadrupolo: Íons de determinada razão m/z são aprisionados em um campo elétrico tridimensional gerado no interior do eletrodo e então ejetados em direção ao detector. Retirado de KICMAN; PARKIN; ILES, 2007.

MS por tempo de voo (TOF-MS).

Conceitualmente, TOF é o espectrômetro mais simples. Basicamente, em uma espectrometria por tempo de voo, íons são gerados em um mesmo instante e acelerados por uma diferença de potencial fixa. A energia potencial elétrica (E_{PEL}) é transformada em energia cinética (E_C). Simplificadamente, podemos escrever:

$$E_C = E_{PEL} \quad (1)$$

$$\frac{mv^2}{2} = z\Delta V \quad (2)$$

$$v = \sqrt{2\Delta V \frac{z}{m}}, \quad (3)$$

... onde v é a velocidade dos íons e ΔV é a diferença de potencial aceleradora. Observa-se que a velocidade é inversamente proporcional a raiz quadrada da razão m/z . Assim, íons com a mesma razão irão adquirir a mesma velocidade após a aceleração. Após atravessarem a região submetida a diferença de potencial, os íons viajam por uma distância fixa em uma corrida até o detector. Ao se determinar o tempo de voo torna-se simples determinar a velocidade e, conseqüentemente, a razão m/z .

O uso de TOF-MS foi historicamente limitado pela dificuldade experimental em se gerar os íons em um mesmo instante. Na década de 1990 o desenvolvimento da MALDI e a determinação da natureza pulsante dos lasers possibilitaram superar esse obstáculo, conferindo ao método uma ótima precisão e resolução experimental (FRANZEN, 1997).

Espectrometria de filtro de massas de potencial quadrupolo (QMF-MS).

Durante as décadas de 70, 80 e 90, a espectrometria do tipo QMF-MS acoplada a cromatografia líquida ou gasosa (LC-MS/GC-MS) foi a técnica mais amplamente usada

devido ao menor custo relativo dos equipamentos, além de fácil automação (GLISH; VACHET, 2003). Na QMF-MS os íons são gerados normalmente pela ESI e acelerados até o espectrômetro com voltagens bem menores que na MALDI-TOF. Após injeção no equipamento, os íons viajam por uma região onde campos elétricos bidimensionais são aplicados perpendicularmente à sua trajetória. O campo elétrico é gerado por potenciais elétricos aplicados uniformemente em quatro bastões cilíndricos, dentre os quais viajam os íons. Trajetórias estáveis são selecionadas para uma faixa de razões m/z , de maneira que o espectrômetro funciona como um filtro de massas. Os parâmetros de estabilidade são funções do potencial de corrente contínua (*Direct current* – DC) e do potencial de radiofrequência (rf) aplicados aos bastões e dependem da razão m/z .

O tratamento matemático para determinar as massas dos íons é significativamente mais complexo que no caso da TOF-MS, mas a análise de parâmetros e diagramas de estabilidade, tornam a análise mais inteligível. Tais parâmetros e diagramas serão analisados em detalhe para espectrômetros QIT.

MS por aprisionamento de íons em potencial quadrupolar (QIT-MS)

Ao contrário dos QMF, no aprisionamento de íons em potencial quadrupolar (*Quadrupole Ion Trap* – QIT) os campos elétricos são gerados nas três dimensões espaciais, de maneira que íons de determinada razão m/z são aprisionados para a determinação do espectro. A LC-MS utilizando um QIT foi a abordagem escolhida para o desenvolvimento deste trabalho. Por essa razão, a seguir ofereceremos um tratamento físico-matemático mais detalhado para discussão do equipamento e da interpretação dos parâmetros e diagramas de aprisionamento, análogos aos parâmetros de estabilidade citados no QMF.

Além de funcionarem como um espectrômetro, os equipamentos QIT podem armazenar íons por um certo tempo. Nas duas situações se aplica o mesmo princípio de potencial elétrico variável aplicado nas três dimensões espaciais. Para uma determinada amplitude e radiofrequência do potencial são aprisionados íons com determinada razão m/z . A razão m/z do íon aprisionado pode ser determinada com o emprego dos parâmetros geométricos do equipamento e do potencial aplicado nos eletrodos. Para os experimentos de QIT-MS, esses íons são posteriormente direcionados a um detector. A seguir, seguimos para uma análise matemática que nos levará ao entendimento dos

parâmetros de aprisionamento, bem como das regiões de estabilidade, condições necessárias para o aprisionamento dos íons.

Em termos de estrutura, QIT são basicamente formados por três eletrodos (Figura 3), um eletrodo em forma de anel e dois eletrodos idênticos que possuem seção transversal hiperbólica e formam as extremidades do equipamento, chamados de eletrodos “*end-cap*”. A seção hiperbólica é ideal para a formação do potencial quadrupolar no interior do aparelho. Pequenos orifícios de entrada e saída dos íons são observados nos eletrodos *end-cap*. Na Figura 33B pode-se observar esquematicamente a seção transversal de um QIT ideal, definindo as dimensões r_0 e z_0 onde r_0 é o raio do eletrodo em forma de anel e z_0 é a metade da distância entre os dois eletrodos *end-cap*. Desde as primeiras descrições dos QIT, a relação entre essas dimensões é dada pela equação (4):

$$r_0^2 = 2z_0^2 \quad (4)$$

A teoria aqui apresentada refere-se ao comportamento de um único íon em um campo quadrupolar e vácuo ideais. O termo quadrupolar refere-se à dependência do potencial de um determinado ponto no interior do equipamento em relação ao quadrado da distância da origem dos eixos (Figura 3B). Íons em campos elétricos quadrupolares sofrem ação de forças restauradoras proporcionais à distância da origem, de uma maneira similar à Lei de Hooke (MARCH, 2009) . Em aparelhos quadrupolares, o potencial elétrico $\phi_{x,y,z}$ em um ponto qualquer pode ser expresso em coordenadas retangulares, da seguinte forma:

$$\phi_{x,y,z} = A(\lambda x^2 + \sigma y^2 + \gamma z^2) + C \quad (5)$$

... onde A é um termo que inclui o potencial de rf aplicado aos eletrodos e o potencial de corrente contínua, mas independente de x , y e z ; C é uma constante relacionada ao aterramento do aparelho; λ , σ e γ são constantes de ponderação. Notadamente, na equação 5, não existem termos cruzados do tipo xy , xz , etc. Tal condição é necessária para que possamos tratar o movimento dos íons nas direções x , y e z de maneira independente.

Em um campo elétrico, a condição de Laplace é satisfeita, ou seja, a segunda derivada do potencial em qualquer ponto é sempre nula. Assim:

$$\nabla^2 \phi_{x,y,z} = \frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \phi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} = 0 \quad (6)$$

tomando as derivadas parciais em relação a x, obtemos:

$$\frac{\partial \phi}{\partial x} = 2A\lambda x \quad (7)$$

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} = \frac{\partial (2A\lambda x)}{\partial x} = 2A\lambda \quad (8)$$

Analogamente:

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial y^2} = 2A\sigma; \quad \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} = 2A\gamma = 0 \quad (9)$$

Assim,

$$\nabla^2 \phi_{x,y,z} = 2A(\lambda + \sigma + \gamma) = 0 \quad (10)$$

Como A não pode ser nulo, obtém-se que:

$$\lambda + \sigma + \gamma = 0 \quad (11)$$

Embora existam infinitas soluções para a equação 11, respeitando a condição de que λ , σ e γ não podem ser nulos, a solução mais simples escolhida em prática para QIT é tal que:

$$\lambda = 1, \sigma = 1, \gamma = -2 \quad (12)$$

Substituindo os valores da equação (12) na equação geral do potencial, a equação (5) se transforma em:

$$\phi_{x,y,z} = A(x^2 + y^2 - 2z^2) + C \quad (13)$$

Seguimos agora para determinar as constantes A e C. Para isso, é conveniente que utilizemos coordenadas cilíndricas (r, θ, z) . Utilizando $x = r \cos \theta$, $y = r \sin \theta$ e $z = z$; obtemos:

$$\phi_{r,z} = A(r^2 - 2z^2) + C \quad (14)$$

Para determinarmos as constantes, devemos analisar a geometria do QIT. Para a formação do potencial quadrupolar, é necessário que a seção transversal dos eletrodos seja hiperbólica. Além disso, tais hipérboles devem possuir assíntotas em comum. Observando os eixos adotados na Figura 33B, escrevemos as equações para a seção transversal do eletrodo em forma de anel:

$$\frac{r^2}{r_0^2} - \frac{2z^2}{r_0^2} = 1 \quad (15)$$

... e para os eletrodos *end-caps*:

$$\frac{r^2}{2z_0^2} - \frac{z^2}{z_0^2} = -1 \quad (16)$$

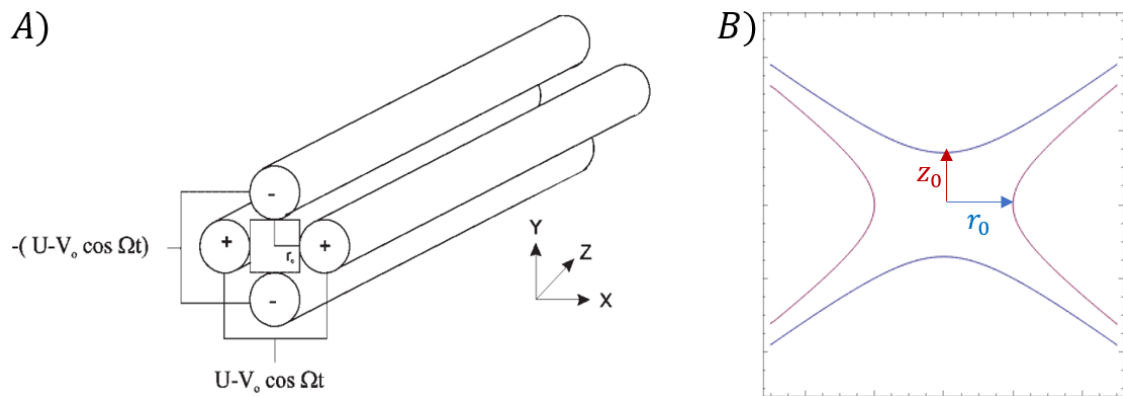


Figura 3 – (A) Representação esquemática dos eletrodos cilíndricos e potenciais aplicados aos mesmos. Retirado de (March, 2009) (MARCH, 2009). (B) Equações (15) e (16) representam as seções transversais das superfícies hiperbólicas dos eletrodos. Gerado pela ferramenta online WolframAlpha (wolframalpha.com).

Potenciais elétricos são aplicados em cada uma das superfícies dos eletrodos. Definimos então um potencial ϕ_0 em termos das diferenças dos potenciais aplicados aos eletrodos, de maneira que:

$$\phi_0 = \phi_{anel} - \phi_{end-caps} \quad (17)$$

Observe que, quando $r = \pm r_0, z = 0$ e quando $z = \pm z_0, r = 0$. Assim:

$$\phi_{anel} = \phi_{r=r_0, z=0} = A(r_0^2) + C \quad (18)$$

e

$$\phi_{end-caps} = \phi_{r=0, z=z_0} = -A(2z_0^2) + C \quad (19)$$

Substituindo as equações (18) e (19) na equação (17), obtemos:

$$\phi_0 = A(r_0^2) + C - [-A(2z_0^2) + C] \quad (20)$$

$$\phi_0 = A(r_0^2 + 2z_0^2) \quad (21)$$

Assim, obtemos a constante A em função do potencial ϕ_0 :

$$A = \frac{\phi_0}{(r_0^2 + 2z_0^2)} \quad (22)$$

Portanto, substituindo o valor de A encontrado na equação (14):

$$\phi_{r,z} = \frac{\phi_0(r^2 - 2z^2)}{(r_0^2 + 2z_0^2)} + C \quad (23)$$

Prosseguimos para determinar a constante C. Em um espectrômetro QIT, os eletrodos *end-caps*, são aterrados (potencial nulo), ou seja, um potencial elétrico é aplicado apenas no eletrodo em forma de anel. Assim:

$$\phi_{end-caps} = \phi_{r=0, z=z_0} = \frac{\phi_0(0^2 - 2z_0^2)}{(r_0^2 + 2z_0^2)} + C = 0 \quad (24)$$

$$C = \frac{2\phi_0 z_0^2}{r_0^2 + 2z_0^2} \quad (25)$$

Finalmente, obtemos a equação geral do potencial $\phi_{r,z}$ para o QIT:

$$\phi_{r,z} = \frac{\phi_0(r^2 - 2z^2)}{(r_0^2 + 2z_0^2)} + \frac{2\phi_0 z_0^2}{r_0^2 + 2z_0^2} \quad (26)$$

Os próximos passos da demonstração visam determinar as componentes radial e axial das forças que agirão sobre os íons submetidos ao potencial quadrupolar. Para isso, devemos obter o campo elétrico responsável por gerar um potencial da forma da equação (26). A seguir, utilizaremos a segunda lei de Newton para obtermos uma equação do movimento de um íon na região do campo elétrico. Por fim, iremos comparar esta equação do movimento com a equação de Mathieu (MATHIEU, 1868) a fim de obter os parâmetros de aprisionamento. Para isso, devemos considerar um potencial ϕ_0 real, da forma:

$$\phi_0 = U + V \cos \Omega t \quad (27)$$

onde, U é um potencial de corrente contínua aplicada ao eletrodo, V é a máxima amplitude do potencial de radiofrequência que oscila com frequência Ω . Substituindo na equação (26):

$$\phi_{r,z} = \frac{(U + V \cos \Omega t)(r^2 - 2z^2)}{(r_0^2 + 2z_0^2)} + \frac{2(U + V \cos \Omega t)z_0^2}{r_0^2 + 2z_0^2} \quad (28)$$

Para obtermos a força que íons estará submetido, devemos encontrar o campo elétrico. Primeiramente calcularemos para a direção axial (z), derivando parcialmente o potencial elétrico em relação a z , mantendo r constante. Dessa maneira:

$$E_z = - \left(\frac{\partial \phi_{r,z}}{\partial z} \right) = - \left[\frac{-4z(U + V \cos \Omega t)}{(r_0^2 + 2z_0^2)} \right] \quad (29)$$

Sabendo que a força elétrica que age sobre uma carga em um campo elétrico é dada pelo produto entre o campo e a carga (aqui denotada pela letra e para que não

haja confusão com a variável z) e, assumindo que a única força presente na situação é a força elétrica, podemos escrever:

$$m \left(\frac{d^2 z}{dt^2} \right) = e \left[\frac{4z(U + V \cos \Omega t)}{(r_0^2 + 2z_0^2)} \right] \quad (30)$$

Ou ainda:

$$\left(\frac{d^2 z}{dt^2} \right) = \left[\frac{4eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)} + \frac{4eV \cos \Omega t}{m(r_0^2 + 2z_0^2)} \right] z \quad (31)$$

A equação (31) será comparada com a Equação de Mathieu em breve, mas, anteriormente, uma breve introdução é conveniente. Equações diferenciais de 2ª ordem do tipo:

$$\frac{d^2 u}{d\varphi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\varphi)u = 0 \quad (32)$$

são denominadas equações de Mathieu, primeiramente estudadas por Émile Léonard Mathieu enquanto estudava as propriedades de membranas oscilantes (MATHIEU, 1868). u e φ são variáveis quaisquer, a_u e q_u são denominados parâmetros de aprisionamento. As equações de Mathieu possuem diversas aplicações em eletrostática, óptica, mecânica quântica, relatividade geral, entre outras (RUBY, 1996).

Para que a equação (31) possa ser diretamente comparada com a equação (32), devemos inicialmente analisar os argumentos dos cossenos e fazer uma mudança de variável na equação de Mathieu, de forma que $\varphi = \Omega t/2$. Para realizarmos a mudança de variável do operador diferencial, escrevemos:

$$\frac{d}{dt} = \frac{d\varphi}{dt} \frac{d}{d\varphi} = \frac{\Omega}{2} \frac{d}{d\varphi} \quad (33)$$

$$\frac{d^2}{dt^2} = \frac{d\varphi}{dt} \frac{d}{d\varphi} \frac{\Omega}{2} \frac{d}{d\varphi} = \frac{\Omega^2}{4} \frac{d^2}{d\varphi^2} \quad (34)$$

Assim, substituindo na equação de Mathieu:

$$\frac{d^2u}{dt^2} = -\frac{\Omega^2}{4} [a_u - 2q_u \cos \Omega t] u \quad (35)$$

Aplicando a propriedade distributiva:

$$\frac{d^2u}{dt^2} = -\left[\frac{\Omega^2}{4} a_u - 2 \frac{\Omega^2}{4} q_u \cos \Omega t \right] u \quad (36)$$

Podemos agora comparar as equações (31) e (36) diretamente ($u = z$) para obter os parâmetros de aprisionamento. Comparando os lados direitos das equações, obtemos:

$$-\frac{\Omega^2}{4} a_z = \frac{4eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)} e \frac{\Omega^2}{2} q_z = \frac{4eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)} \quad (37)$$

Dessa maneira, os parâmetros de aprisionamento são:

$$a_z = -\frac{16eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} e q_z = \frac{8eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad (38)$$

Se repetirmos o processo de derivação para a direção radial obtemos os parâmetros de aprisionamento para a componente radial do movimento, de maneira que é válida a relação:

$$a_z = -2a_r \text{ e } q_z = -2q_r \quad (39)$$

... devido a relação entre os parâmetros λ , σ e γ descrita na equação (12).

Assim, o funcionamento de um QIT é determinado pela estabilidade ou instabilidade na trajetória de um íon submetido ao potencial quadrupolar, sendo as condições experimentais determinantes para a destinação do íon. Soluções gerais da Equação de Mathieu resultam em regiões cujos limites correspondem às fronteiras das regiões de estabilidade. Para o aprisionamento e detecção dos íons, sua trajetória deve ser estável nas coordenadas r e z , sendo os parâmetros descritos na equação 38 os fatores responsáveis por tal estabilidade.

Destaca-se aqui que os parâmetros dependem de U , V , Ω , dos parâmetros geométricos r_0 e z_0 e da razão carga-massa do íon. U , V , Ω são parâmetros da voltagem aplicada no eletrodo em forma de anel, ou seja, conhecidos e ajustáveis, enquanto os parâmetros geométricos r_0 e z_0 são características do equipamento. Dessa maneira, a razão carga-massa é o único parâmetro desconhecido, podendo então ser obtido a partir dos demais parâmetros.

Neste trabalho, utilizaremos QIT-MS para a análise de células humanas transfectadas com a proteína latente de membrana 1 (*Latent Membrane Protein 1 – LMP1*) que apresenta elevado potencial oncogênico, avaliando o potencial da técnica em análises proteômicas em contextos de avaliação de potencial tumorigênico. Atualmente, as principais estratégias para a identificação, classificação e estabelecimento do prognóstico de cânceres se baseiam em técnicas morfológicas clássicas, particularmente a análise histopatológica, com ou sem subsídio de técnicas complementares, como a imuno-histoquímica. Graças ao potencial da MS para a identificação de biomarcadores, o desenvolvimento dessa tecnologia proporcionou nova perspectiva para a identificação e classificação de tumores de maneira complementar as técnicas clássicas (HOLZLECHNER; EUGENIN; PRIDEAUX, 2019). Além disso, análises genômicas e proteômicas, utilizando MS quantitativa, revelam uma visão mais ampla da biologia tumoral, podendo ter importantes implicações clínicas (ZHANG et al., 2019).

1.2 Cânceres e infecção pelo vírus de Epstein-Barr

1.2.1 Cânceres: generalidades

De acordo com Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization – WHO*), dentre 57 de 183 países analisados os cânceres foram a principal causa de morte antes dos 70 anos (SUNG et al., 2021). Dados do programa GLOBOCAN, da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Cancer Research – IARC*), indicam aproximadamente 19,3 milhões de novos casos de cânceres e aproximadamente 10,0 milhões de óbitos relacionados em 2020 (SUNG et al., 2021). Os cânceres de mama em mulheres são os mais frequentemente diagnosticados (11,7% dos

novos casos), tendo ultrapassado os cânceres de pulmão (11,4%). Apesar disso, os cânceres de pulmão ainda apresentam maior letalidade, respondendo por 18% dos óbitos por cânceres em 2020. Em termos gerais, admite-se que a incidência e mortalidade pelos cânceres vêm crescendo em ritmo acelerado, refletindo o envelhecimento da população e o aumento da prevalência de diversos fatores de risco. Em geral, os cânceres constituem uma importante causa de morte em todas as regiões do mundo. Digno de nota, o risco de morte devido ao câncer entre mulheres na África em 2020 foi comparável aos riscos observados em mulheres na América do Norte e países com maior renda da Europa (SUNG et al., 2021).

O termo “câncer” engloba algumas centenas de doenças com características epidemiológicas, biológicas e clínicas muito diversas. Cânceres são doenças neoplásicas malignas, i.e., com grande agressividade biológica comparativamente às neoplasias ditas benignas. O termo “neoplasia”, por sua vez, define um amplo grupo de doenças caracterizadas essencialmente por acúmulo anormal de células em um tecido. Esse acúmulo decorre de comprometimento de mecanismos homeostáticos de regulação da população celular do tecido afetado, fundamentalmente expresso por exacerbação das taxas de proliferação celular e redução das taxas de morte celular.

Ainda que as diferenças entre os diferentes cânceres descritos sejam marcantes, essas doenças compartilham algumas propriedades patogénicas importantes. Originalmente proposto por Hanahan e Weinberg, um modelo teórico de características singulares (“*Hallmarks*”) compartilhadas por essas doenças incluem um total de dez características, sendo seis os chamados *hallmarks* clássicos: autossuficiência em estímulos de crescimento, evasão de estímulos supressores de crescimento, imortalização celular, capacidade de invasão e metástases, estimulação de angiogênese, resistência à apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2000) e outros quatro *hallmarks* foram adicionados em revisão posterior: imunoevasão, metabolismo energético alterado, instabilidade genética e inflamação tumor-induzida (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Diversos fatores contribuem para a carcinogênese, notadamente exposições ambientais e a adoção de determinados comportamentos e estilos de vida nocivos, tais como o hábito de fumar, sedentarismo, alimentação desbalanceada, consumo de álcool, dentre outros. Dados etiológicos essenciais sobre a maior parcela dos cânceres

ocorrendo em adultos emergiram no início dos anos 1980, quando se estimou que 35% de todos os cânceres nos EUA estavam associados a hábitos alimentares. Ademais, em 1978 aproximadamente 30% de todos os desfechos letais decorrentes de tumores malignos foram associados ao tabagismo (DOLL; PETO, 1981). Ainda, 2,2 milhões de novos casos de cânceres em 2018 foram associados a algum agente infeccioso, perfazendo cerca de 13% de todos os casos (DE MARTEL et al., 2020). As exposições de natureza infecciosa reconhecidas como cancerígenas para humanos pela IARC incluem infecções causadas por sete vírus, uma bactéria e dois parasitas (IARC, [s.d.]). Digno de nota, a associação desses agentes infecciosos com o câncer é mais prevalente em países em desenvolvimento (DE MARTEL et al., 2020).

O primeiro agente infeccioso formalmente vinculado ao desenvolvimento de cânceres em humanos foi o EBV, descoberto em 1964 em células malignas de linfoma de Burkitt (*Burkitt Lymphoma* – BL) (EPSTEIN; ACHONG; BARR, 1964). Desde então, outras infecções têm sido associadas ao desenvolvimento de neoplasias em humanos, incluindo aquelas causadas pelos vírus das hepatite C (*Hepatitis C vírus* – HCV) e B (*Hepatitis B vírus* – HBV), pelo vírus do papiloma humano (*human papillomavirus*– HPV), pelo vírus associado ao sarcoma de Kaposi (*Kaposi sarcoma-associated herpesvirus* – KSHV), pelo EBV, pela bactéria *Helicobacter pylori* e pelos helmintos *Clonorchis sinensis* e *Opisthorchis viverrini*. (OH; WEIDERPASS, 2014). Dentre as infecções com potencial cancerígeno para humanos, a causada pelo EBV merece particular atenção devido a virtual onipresença da infecção viral vírus em populações humanas e seu elevado potencial oncogênico, conforme detalhado a seguir.

1.2.2 *Biologia e carcinogenicidade do EBV*

Formalmente denominado gamaherpesvírus humano 4 (*Human Gamma Herpesvirus 4* – HHV-4), o EBV pertence à família *Herpesviridae* (ordem *Herpesvirales*), composta por vírus de DNA que caracteristicamente estabelecem infecções persistentes em seus hospedeiros (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV). Estima-se que o EBV infecte mais de 90% da população mundial, persistindo durante toda vida do hospedeiro após a infecção primária (COHEN, 2000). O principal alvo do EBV é o linfócito B, célula na qual estabelece infecção latente e que comumente sofre imortalização em decorrência da infecção viral (KAMRANVAR; MASUCCI, 2017).

O EBV foi originalmente identificado com análises por microscopia eletrônica de células malignas do BL, mas atualmente é descrita sua participação no desenvolvimento de diversos outros cânceres humanos, originados principalmente em tecidos linfoides e epiteliais (KUTOK; WANG, 2006). Estima-se que cerca de 300 mil novos casos de cânceres e cerca de 170 mil óbitos decorrentes dessas doenças estejam relacionadas à infecção pelo EBV anualmente (WONG et al., 2022). No período de 1990 a 2010, o número de casos letais de BL, linfoma de Hodgkin (*Hodgkin Lymphoma* – HL) e adenocarcinoma gástrico (*Gastric Adenocarcinoma* – GAC) associados ao EBV têm se mantido constantes, mas o número de óbitos por carcinomas de nasofaringe (*Nasopharyngeal Carcinoma* - NPC) aumentou significativamente (Figura 4) (KHAN; HASHIM, 2014). Dados como esse explicitam a complexa etiologia dos cânceres associados ao vírus e demonstram a importância de estudos sobre os mecanismos patogênicos da carcinogênese associada à infecção pelo EBV.

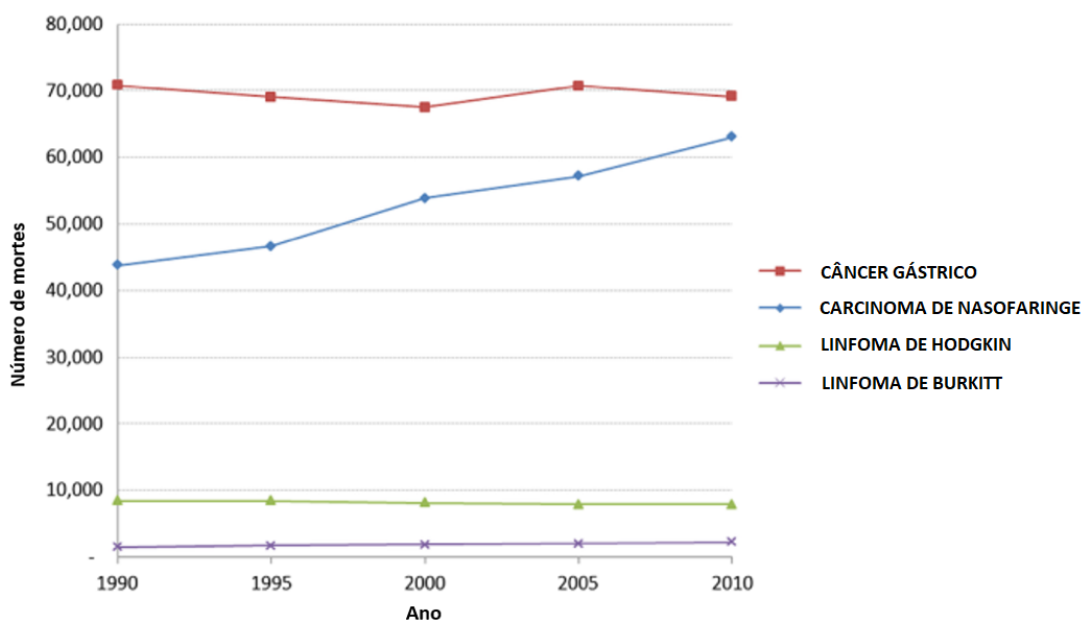


Figura 4 – Número de desfechos fatais de cânceres relacionados à Infecção pelo EBV no período de 1990-2010. Figura adaptada de Kahn e Hashim (2014) (KHAN; HASHIM, 2014)

O contágio pelo vírus ocorre por meio da saliva, sendo que a infecção primária usualmente é assintomática, passa despercebida ou está associada a um quadro de mononucleose infecciosa, notadamente quando ocorre em adolescentes ou jovens adultos. Admite-se que linfócitos B circulantes sejam o compartimento da latência viral

do EBV no hospedeiro, notadamente células imortalizadas pelo vírus. Por outro lado, a infecção de células epiteliais pelo EBV comumente resulta em propagação do vírus, com pouca ou nenhuma latência detectada. Outros potenciais reservatórios orgânicos do vírus em estado de latência incluem a medula óssea, linfonodos e outros órgãos do sistema linfoide (MURATA et al., 2021).

O genoma do EBV é composto de DNA de cadeia dupla com aproximadamente 172 kbp. Codifica mais de 90 produtos virais, incluindo proteínas importantes na regulação da expressão de genes virais e celulares, e moduladores da sinalização intracelular e resposta imunitária do hospedeiro. Diferentes produtos virais são expressos durante as fases lítica e latente da infecção viral. Na infecção lítica são comumente expressas proteínas diretamente ligadas à replicação do DNA viral, incluindo a DNA polimerase e timidina-quinase virais, além das proteínas estruturais que formam o capsídeo do EBV. A maioria das sequências codificantes do EBV é expressa nessa fase. Durante a infecção latente tipicamente ocorre expressão da proteína do antígeno nuclear 1 (*Epstein-Barr nuclear antigen 1* – EBNA1), que proporciona manutenção do DNA viral como epissoma no núcleo da célula infectada, além de determinados RNA virais não-codificantes, como os pequenos RNAs codificados pelo EBV (*Epstein-Barr encoded small RNAs* – EBERs). Na latência não há produção de partículas virais, mas ocorre replicação do genoma viral concomitantemente ao genoma celular, e ambos são segregados para as células filhas (MÜNZ, 2019).

Quatro programas de latência do EBV são convencionalmente discriminados de acordo com o conjunto de produtos virais comumente detectados durante essa fase do ciclo biológico viral, denominados latências tipo zero, I, II e III. *In vivo*, linfócitos B de memória infectados expressam essencialmente EBERs, situação referida como latência tipo “zero”. Na latência tipo I (típica de células EBV-positivas do BL e GAC), além dos EBERs também é detectada a expressão de EBNA1. A latência tipo II (observada em células neoplásicas EBV-positivas de alguns linfomas e no NPC) se caracteriza pela expressão de EBNA1 e EBERs, acrescida de proteínas latentes de membrana 1 e 2 (*Latent Membrane Proteins* – LMP1 e LMP2). Por fim, a latência tipo III – linfócitos imortalizados pelo EBV e linfócitos na doença linfoproliferativa pós-transplante (*Pos-Transplant Lymphoproliferative Disease* – PTLD) – se caracteriza pela expressão da maioria dos

genes virais de ciclo latente, tais como EBERs, EBNAs 1, 2, 3 e EBNA-LP, LMPs 1 e 2, além de transcritos gerados a partir de porção à direita do segmento BamHI-A do genoma viral (*BamHI-A rightward transcripts* – BARTs) (MURATA et al., 2021).

Subsequentemente à infecção primária o EBV é capaz de persistir por toda a vida do hospedeiro, indicativo de que o vírus tem mecanismos eficazes de evasão das respostas de defesa do organismo. Sabe-se, por exemplo, que o genoma do EBV codifica BCRF1, uma proteína viral que compartilha 70% de identidade com a interleucina 10 (IL-10) humana (MOORE et al., 1990; VIEIRA et al., 1991), que atua inibindo a atividade citotóxica de linfócitos T e NK. Também codifica BARTF1, uma proteína que simula receptor para o fator estimulador de colônias 1 (*Colony-stimulating factor 1* – CSF-1), de modo a desempenhar papel de regulação de componentes do sistema imunitário (COHEN; LEKSTROM, 1999, p. 1). O EBV também produz proteínas que regulam a apoptose, tais como BHRF1, homóloga à proteína antiapoptótica humana bcl-2 (HENDERSON et al., 1993), e LMP1, que ativa vias intracelulares de sinalização que proporcionam fenótipo de resistência à apoptose para as células infectadas pelo vírus (MORRIS; DAWSON; YOUNG, 2009).

A LMP1 é uma proteína constantemente ativa e responsável por diversas funções no ciclo biológico do EBV. Além disso, é a proteína do EBV mais estudada em virtude de suas propriedades oncogênicas, sendo essencial para a transformação e proliferação celular, promovendo a oncogênese pela manipulação dos mais diversos processos celulares (WANG; NING, 2021). Sendo assim, como descrito a seguir, o papel da LMP1 é indispensável para o potencial oncogênico do EBV.

Proteína LMP1 do EBV

A LMP1 do EBV é estruturalmente formada por seis regiões transmembranares, um domínio N-terminal citoplasmático (aproximadamente 23aa) e uma longa cauda citoplasmática na região C-terminal (cerca de 200aa). Essa oncoproteína viral funcionalmente mimetiza a ação da glicoproteína celular CD40, que é essencial para proliferação dos linfócitos B. A sinalização pela CD40 se inicia pela ligação dessa molécula com seu ligante (CD40L) na superfície celular ou pela ligação a anticorpos. Entretanto, diferentemente da CD40 celular, a LMP1 do EBV sofre autoagregação na membrana plasmática independentemente de ligandos extracelulares, deflagrando

ativação constitutiva de vias intracelulares de sinalização (**Figura 5**) (WU et al., 2005). Esse desequilíbrio de vias de sinalização intracelular que controlam a diferenciação e sobrevivência dos linfócitos B pode contribuir na transformação de células expressando a LMP1 (MECKES; MENAKER; RAAB-TRAUB, 2013; MORRIS; DAWSON; YOUNG, 2009).

De modo semelhante à CD40, a LMP1 do EBV se liga direta ou indiretamente a moléculas da classe dos receptores associados aos fatores de necrose tumoral (*Tumor necrosis receptor-associated factors* – TRAFs), ocasionando uma cadeia de eventos que culminam principalmente na ativação da via NF- κ B, mas também de outras, como MAPKs, JNK/SAPK, PI3K/AKT e JAK/STAT. Digno de nota, a ativação dessas vias de sinalização intracelular contribui substancialmente na capacidade de LMP1 transformar linfócitos B e fibroblastos *in vitro* (DEVERGNE et al., 1996; MAINOU; EVERLY; RAAB-TRAUB, 2005).

Apesar de apresentarem grandes diferenças de estrutura e sequência, tanto a CD40 quanto a LMP1 possuem em seus domínios citoplasmáticos um motivo de ligação PxQxT capaz de sequestrar TRAFs (HUEN et al., 1995), proteínas adaptadoras responsáveis pela ativação de vias de sinalização que culminam na ativação de caspases e apoptose, regulando a vida e a morte celular (ARCH; GEDRICH; THOMPSON, 1998). A região da LMP1 que contém o motivo de ligação PxQxT – conhecida como região C-terminal de ativação 1 (*Carboxyl-Terminal Activation Region 1* – CTAR1) – é conservada em todas as variantes expressas da proteína. Diferentemente de CTAR1, a região CTAR2 não se liga diretamente aos TRAFs, mas interage indiretamente com TRAF2 mediante ligação com o domínio de morte associado ao TNFR1 (*TNFR1-associated death domain protein* – TRADD) (KIESER; KAISER; HAMMERSCHMIDT, 1999). Além disso, foi demonstrado que o CTAR2 interage com a molécula adaptadora denominada de proteína de ligação ao receptor (*Receptor Interacting Protein* – RIP) (LI; CHANG, 2003). Ainda, há uma região localizada entre CTAR1 e CTAR2 denominada CTAR3, que interage com o promotor da Janus Quinase 3 (*Janus Kinase 3* – JAK3) e proporciona ativação da via JAK/STAT, o que favorece a proliferação de células de epitélio de nasofaringe (NP69) (ZHANG et al., 2020).

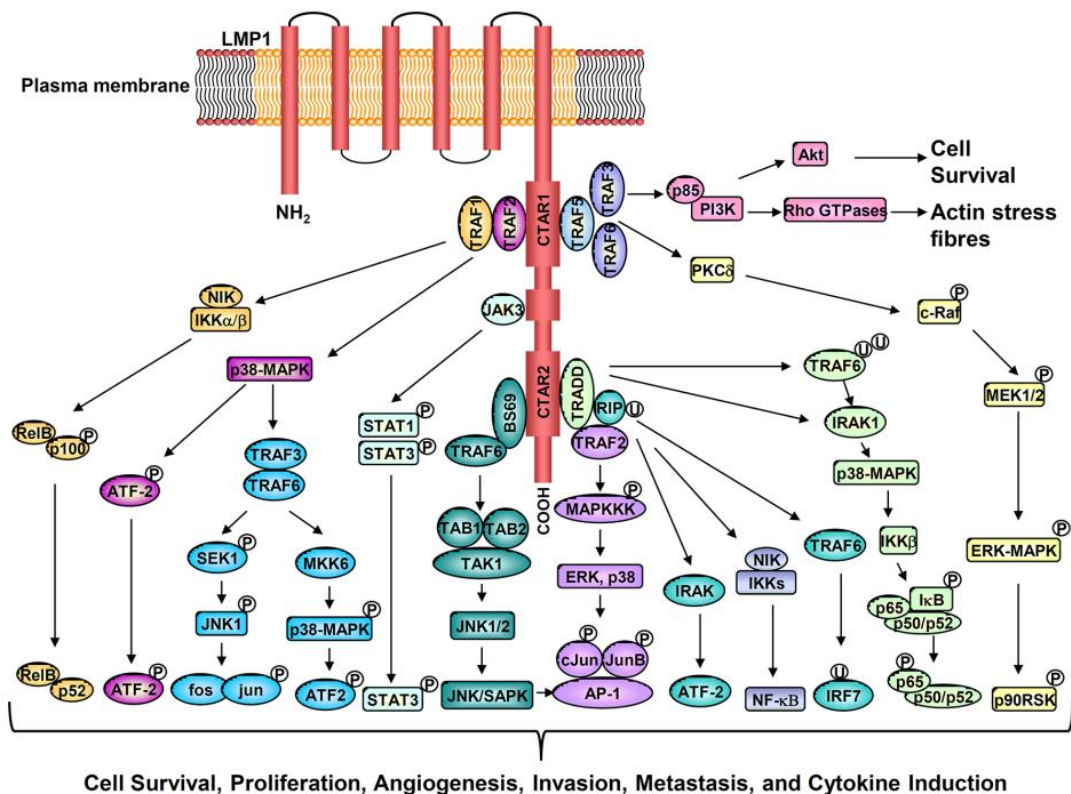


Figura 5 – Estrutura e ativação de diversas vias de sinalização pela LMP1 promovem a sobrevivência celular, proliferação, angiogênese, metástase e a indução da produção de citocinas. Retirado de LO et al., 2021.

Ainda precisa ser mais bem elucidada a maneira exata pela qual o sequestro de TRAFs e outras moléculas adaptadoras leva a eventos em cadeia que culminam na ativação de fatores de transcrição. Por outro lado, a capacidade da EBV LMP1 ativar uma variedade de vias de sinalização é essencial para a deflagração de seu potencial oncogênico. Experimentos *in vitro* demonstraram que a transformação de fibroblastos humanos e de roedores por LMP1 depende da ativação CTAR1-dependente da via PI3K (MAINOU; EVERLY; RAAB-TRAUB, 2005), crucial na patogênese de vários cânceres humanos (WONG; ENGELMAN; CANTLEY, 2010).

As proteínas da família NF-κB apresentam um domínio altamente conservado de dimerização, que quando ocorre propicia a formação de um fator de transcrição. Os dímeros formados por subunidades de proteínas NF-κB são mantidos em maiores concentrações no citoplasma pela ação de proteínas IκB, reguladoras negativas da ativação da via. Uma vez deflagrada, a ativação canônica da via NF-κB ocorre mediante a formação de um complexo de proteínas na membrana cuja composição não está

suficientemente elucidada, mas inclui TRAFs, TRADD, RIP. Esse complexo proporciona fosforilação e consequente ubiquitinação de I κ B, induzindo sua degradação e, consequentemente, liberação das subunidades de NF- κ B e sua associação. Dímeros de NF- κ B formados (p50-p65, por exemplo) são carregados e acumulam-se no núcleo celular, onde passam a regular a transcrição de genes NF- κ B-responsivos (DE OLIVEIRA; BALLON; CESARMAN, 2010).

Muitos dos efeitos decorridos da expressão da LMP1 decorrem da ativação da NF- κ B pela ligação do TRAF2 pelo CTAR1 – diretamente pelo motivo PxQxT, ou pela captura do TRAF2 a partir da ligação do CTAR2 ao TRADD. Em células epiteliais de nasofaringe, foi demonstrado que a LMP1, mediante ativação do fator de transcrição, é capaz de regular a expressão do gene *ID1* (HGNC:5360), que expressa uma proteína hélice-loop-hélice (HLH) que age como um regulador negativo de transcrição da proteína p16^{INK4a}, produto do gene supressor tumoral *CDKN2A* (HGNC:1787). O controle da expressão do gene *ID1* facilita a imortalização e proliferação celular, podendo promover a transformação de lesões pré-cancerígenas (LI et al., 2004).

Diversas variantes naturais de sequência da LMP1 já foram descritas, tais como Alaskan, China 1, China 2, Med+, Med- e NC. Um indivíduo infectado pelo EBV pode apresentar mais de uma variante e foi demonstrado que todas conseguem transformar células *in vitro*, apesar de apresentarem diferentes taxas de ativação das vias de sinalização. A distribuição geográfica dessas variantes, aliada às diferentes propriedades moleculares de cada uma delas, pode contribuir para a distribuição geográfica e tendências étnicas de doenças como o NPC, que ocorre frequentemente no sul da China, sudeste da Ásia, África do Norte e no Alasca (MAINOU; RAAB-TRAUB, 2006).

Quando comparadas à LMP1 derivada do EBV protótipo B95.8, algumas variantes da oncoproteína viral têm maior potencial de ativação de NF- κ B, incluindo duas derivadas de NPC e uma variante europeia. Essas três variantes compartilham uma substituição de três aminoácidos na porção N-terminal que nenhuma outra LMP1 possui, indicando um mecanismo diferente de ativação da NF- κ B dependente da porção N-terminal da proteína. Uma variante norte-africana derivada de NPC também apresenta maior taxa de ativação da via NF- κ B atribuída a uma mudança em cinco aminoácidos em região transmembrana da LMP1 (MILLER et al., 1998).

As evidências citadas anteriormente sugerem uma importante influência das variantes da oncoproteína LMP1 em seu potencial de ativar vias de sinalização intracelular, com reflexos na regulação da sobrevivência da célula infectada pelo EBV e possivelmente seu potencial oncogênico. Nesse sentido, este trabalho visa validar uma metodologia de análise de dados de MS de lisados totais de células transfectadas pela EBV LMP1 para futura aplicação na identificação de proteínas diferencialmente expressas por diferentes variantes da LMP1.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo visa avaliar e comparar o perfil de expressão global de proteínas de células humanas transfectadas pela oncoproteína LMP1 do EBV, de modo a identificar proteínas e vias de sinalização intracelular potencialmente reguladas.

2.2 Objetivos específicos

- a) Validar vetores já construídos para expressão da EBV LMP1;
- b) Avaliar a expressão de EBV LMP1 em células humanas transfectadas em nível transcricional;
- c) Utilizar MS para sequenciar e quantificar o proteoma global das células transfectadas com EBV LMP1, identificando possíveis diferenças de expressão em proteínas celulares relevantes no processo de carcinogênese.
- d) Propor uma metodologia de análise para futura comparação entre proteomas de células transfectadas com diferentes variantes da EBV LMP1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A **Figura 6** apresenta o delineamento geral do estudo, detalhado nas seções subsequentes.

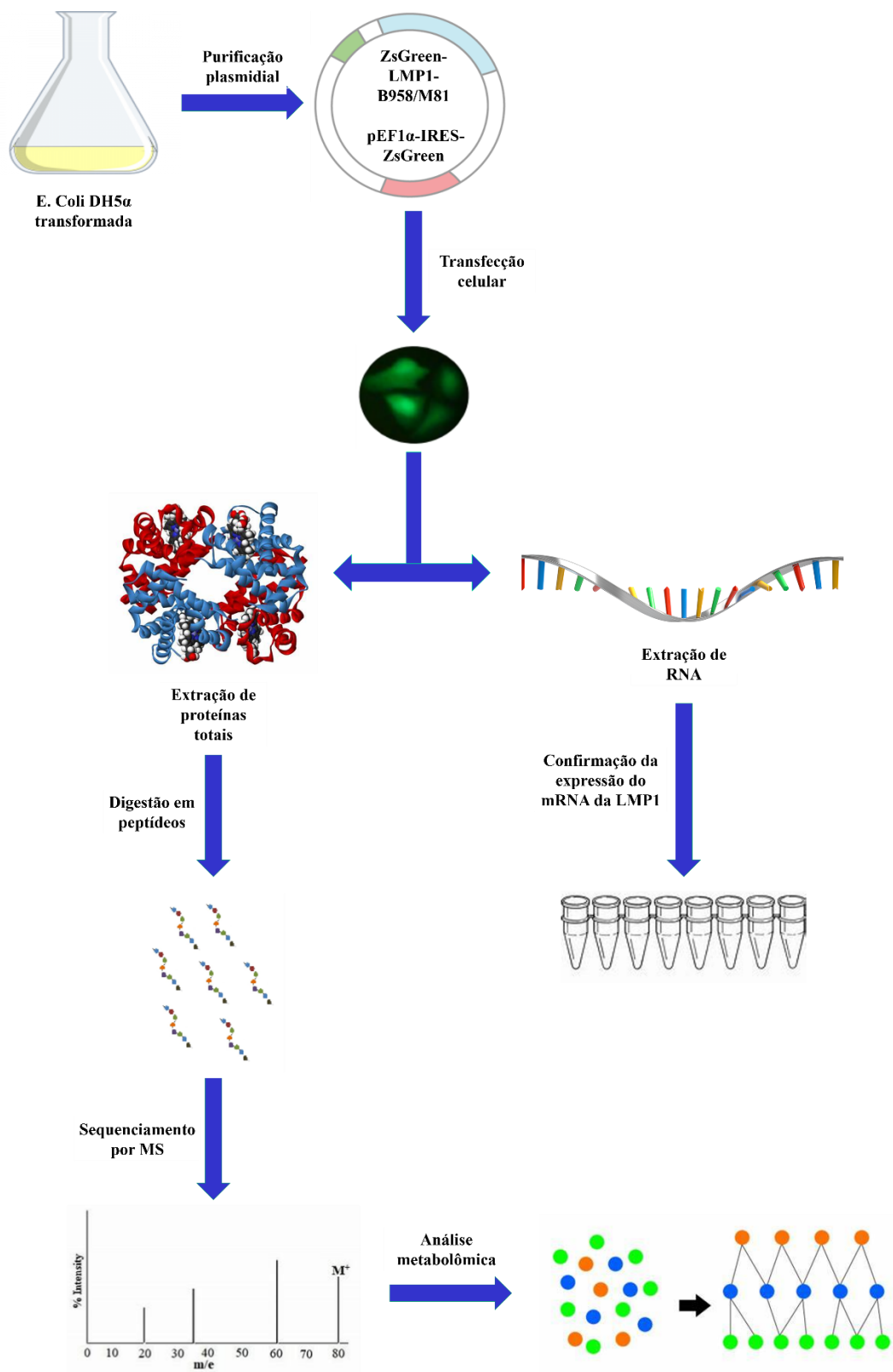


Figura 6 – Delineamento geral do estudo.

3.1 Células empregadas e Cultivo Celular

Para as análises foram empregadas células da linhagem HEK293, por serem altamente suscetíveis a transfecção celular utilizando carreadores lipídicos. Após descongelamento, as células foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dubecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – DMEM) suplementado de 10% de soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum* – FBS) e 0,4% de gentamicina, a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂ e mantidas em cultura por uma semana previamente aos experimentos de transfecção celular.

3.2 Vetores para expressão constitutiva de EBV LMP1

Os vetores ZsGreen-LMP1-B958 e ZsGreen-LMP1-M81 apresentam ORFs das variantes EBV LMP1-B95-8 (GenBank #CAD53472.1) e EBV LMP1-M81 (GenBank #AGZ95236.1), respectivamente (Figura 7). Esses vetores foram construídos previamente utilizando o vetor base comercial pEF1α-IRES-ZsGreen (Clontech, Mountain View, CA, USA)(MÜLLER COAN et al., 2022) e foram revalidados quanto à presença da ORF da LMP1. Em síntese, foi efetuada PCR empregando os iniciadores CGT TAT GAG TGA CTG GAC TGG A e TGA ACA GCA CAA TTC CAA GG. Os constituintes de reação foram: tampão de PCR 1x, 0,20mM dNTPs, 3mM MgCl₂, 1U Taq DNA polimerase, 0,3pmol de iniciadores e água ultrapura para volume final de 25µl. O perfil de termociclagem empregado foi de 95°C por 5 min; 95°C por 60s, 55°C por 60s, 72°C por 40s (40x); e 72°C por 10 min. A validação dos vetores foi realizada por meio de reação de cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) para amplificação de segmento de segmento de 290pb do gene BNLF1, codificador da LMP1.

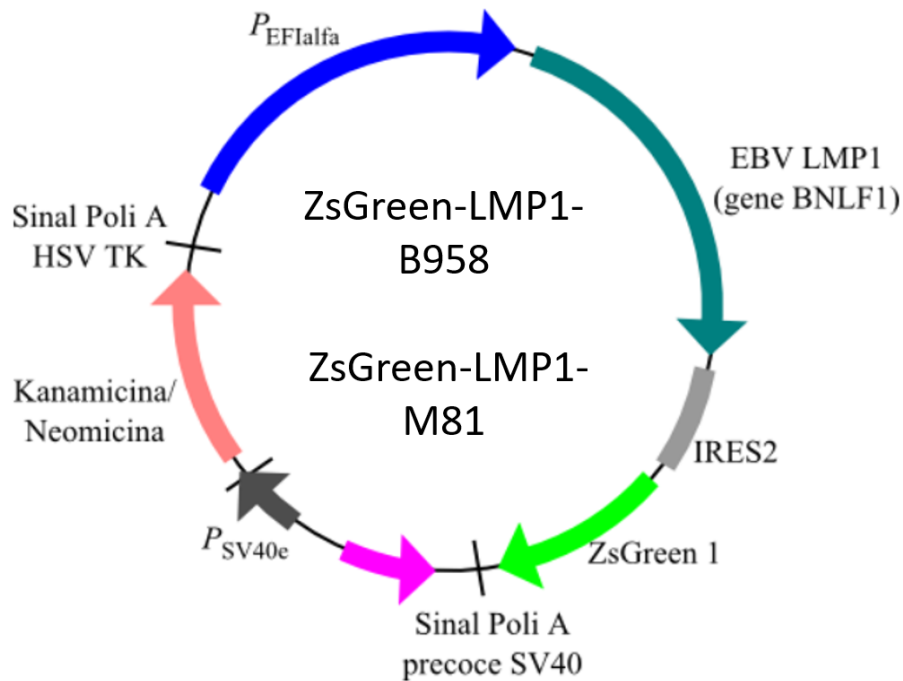


Figura 7 – Mapa dos construtos utilizados para a expressão constitutiva de LMP1. Adaptado de COAN, 2016.

3.3 Preparação dos vetores e transfecção celular

Para se obter os vetores para a transfecção celular, bactérias *E. Coli* DH5 α *Subcloning Efficiency*[®] previamente transformadas com os vetores ZsGreen-LMP1-B958, ZsGreen-LMP1-M81 e o vetor-base (*backbone*) comercial pEF1 α -IRES-ZsGreen1 (Clontech, Mountain View, CA, USA)(MÜLLER COAN et al., 2022) foram cultivadas em meio líquido Lúria-Bertani (LB) acrescido de kanamicina (50 μ g/mL) e mantidas a 37°C por 16h sob agitação constante (220 rpm). Subsequentemente foi efetuada purificação plasmidial com o sistema *PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit* (ThermoFischer Scientific). A confirmação da purificação dos vetores contendo o gene BNLF1 foi obtida por PCR como previamente descrito (Item 3.2).

Na transfecção celular foram empregadas células HEK293 cultivadas como descrito previamente. No dia anterior a transfecção, as células foram plaqueadas a uma confluência de 60-70% em placas de 6 poços (densidade inicial de 1,75x10⁵ células), sendo então transfectadas com os vetores ZsGreen-LMP1-B958, ZsGreen-LMP1-M81 e pEF1 α -IRES-ZsGreen de modo transiente. Esses experimentos foram efetuados

empregando carreador lipídico *Lipofectamine*[®] 3000 (ThermoFisher), de acordo com protocolo proposto pelo fabricante.

3.4 Extração de RNA total e análise da expressão de LMP1 em nível transcricional

Para confirmação da expressão de LMP1 em nível transcricional, após 72h as células transfectadas foram submetidas a extração de RNA total utilizando o reagente *TRIzol*[™] (ThermoFischer), de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA total foi realizada em equipamento NanoVue (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK, England) e o RNA extraído foi tratado com enzima *Invitrogen*[™] *Dnase I, Amplification Grade* (ThermoFischer) para eliminação de DNA contaminante. As amostras foram então empregadas na produção de cDNA com enzima *GoScript*[™] *Reverse Transcriptase* (Promega), conforme instruções do fabricante. Subsequentemente foi efetuada à amplificação de transcritos de LMP1 por PCR empregando os iniciadores e condições previamente apresentados. Os iniciadores empregados possibilitam discriminar entre DNA do construto ou cDNA devido a uma redução de 78pb (região intrônica) no transcrito da LMP1 em relação ao segmento derivado do genoma viral, resultando em um amplicon esperado de 212pb para o mRNA de LMP1.

3.5 Extração e quantificação de proteínas totais

Células HEK293 transfectadas para expressão transiente de EBV LMP1 (provenientes do mesmo lote experimental empregado na confirmação de expressão de LMP1 em nível transcricional) foram utilizadas para extração total de proteínas. Baseado em procedimento previamente reportado (VAN DER PLAS-DUIVESTIEN et al., 2014), foi empregada solução tampão livre de detergentes composta de 8 M ureia, 75 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.2, 50 U/mL benzonase, 2 mM MgCl₂, acrescida de coquetel de inibidores de protease livre de EDTA (*Complete*[™] *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* – Roche Life Science, Indianapolis, IN, USA). Em síntese, células em cultivo foram lavadas com DPBS a 4°C, centrifugadas por 5 min a 1500 x *g*, ressuspensas no tampão de lise (500 µL para cada 10⁷ células) e então submetidas a sonicação com pulsos de 20% de amplitude por 30 s (5 s ligado, 5 s desligado) em gelo empregando sonicador. As amostras foram então incubadas por 30 min em gelo úmido e centrifugadas a 18.000 x

g a 4°C. O sobrenadante coletado foi submetido a estimativa de concentração proteica empregando o reagente *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories) e padrões de concentrações de referência de albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin – BSA*) fornecidos no kit *Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set* (Bio-Rad Laboratories). As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento das análises.

3.6 Identificação de proteínas por MS

3.6.1 Digestão Enzimática das proteínas presentes nas amostras em solução

As amostras de proteínas foram então diluídas em bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3 ; AmBic) para atingir uma concentração de 50 mM. As amostras foram então tratadas com uma solução surfactante 0,2% do reagente *RapiGest SF* (Waters™, Milford, MA, USA), adicionado a 50 µL de cada amostra, incubadas por 60 min a 37°C. Após incubação, foram adicionados 100 mM DDT (dithiothreitol) e 3 mM IAA (2-iodoacetamida) às amostras, que foram incubadas por mais 30 min a temperatura ambiente. A digestão das amostras foi realizada pelo tratamento com tripsina modificada para sequenciamento (*Sequencing Grade Modified Trypsin – Promega*) 0,1 µg/µL a 37°C por 16h. As reações de proteólise foram interrompidas pelo tratamento das amostras com ácido trifluoroacético 5% (TFA, v/v) e incubação por 90 min a 37°C. Subsequentemente as amostras foram centrifugadas por 30 min a 16,000 x g, 4°C para remoção de porções insolúveis. O sobrenadante contendo os peptídeos solúveis foi coletado e secado *overnight* no equipamento *VacuFuge® Concentrator Plus* (Eppendorf, Hamburg, HH, Germany). Os peptídeos foram dessalinizados, purificados e concentrados com emprego de colunas *Pierce™ C18 Spin* (Thermo Fisher), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.6.2 Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas e identificação das proteínas presentes nas amostras

Para identificar e quantificar proteínas diferentemente expressas em células HEK293 transientemente transfectadas com as variantes B95-8 e M81 da LMP1, as amostras foram submetidas a MS seguida por análise de sequenciamento utilizando um sistema em *tandem* de LC-MS – *UltiMate 3000 LC liquid nanochromatography*

system (LC Packings DIONEX, Sunnyvale, CA, USA) associado ao equipamento *Q-Exactive™ Plus* (Thermo Fisher). Os parâmetros de análise foram previamente descritos (PROSPERO et al., 2021) e as proteínas foram identificadas utilizando o software PatternLab versão 4.0.0.84 (CARVALHO et al., 2016) com o proteoma de *Homo sapiens* (UniProt ID: UP000005640) como referência. A tolerância de massa para fragmento foi ajustada para 40 ppm com uma taxa de falsa descoberta (*False Discovery Rate* – FDR) menor ou igual a 1%. As proteínas identificadas foram submetidas a análise de parcimônia e os dados de metabolômica foram analisados com a ferramenta online *WebTool MetaboAnalyst* (<https://www.metaboanalyst.ca>) (PANG et al., 2021). As análises funcionais foram feitas utilizando as bases de dados STRING (<https://string-db.org>) (SZKLARCZYK et al., 2021) e PANTHER (<https://pantherdb.org>) (MI et al., 2019).

4 RESULTADOS

4.1 Preparo dos vetores e transfecção celular

Para a transfecção celular foram empregados os vetores de expressão ZsGreen-LMP1-B958, ZsGreen-LMP1-M81 e pEF1 α -IRES-ZsGreen, incorporados na forma de plasmídeos em bactérias conservadas em glicerol. As bactérias foram recuperadas de estoques criopreservados do grupo *ViriCan* e cultivadas em meio LB para a purificação plasmidial. Subsequentemente os vetores foram submetidos a PCR para a verificação da presença das ORFs das variantes da LMP1 pela identificação do amplicon esperado de 290pb (Figura 8).

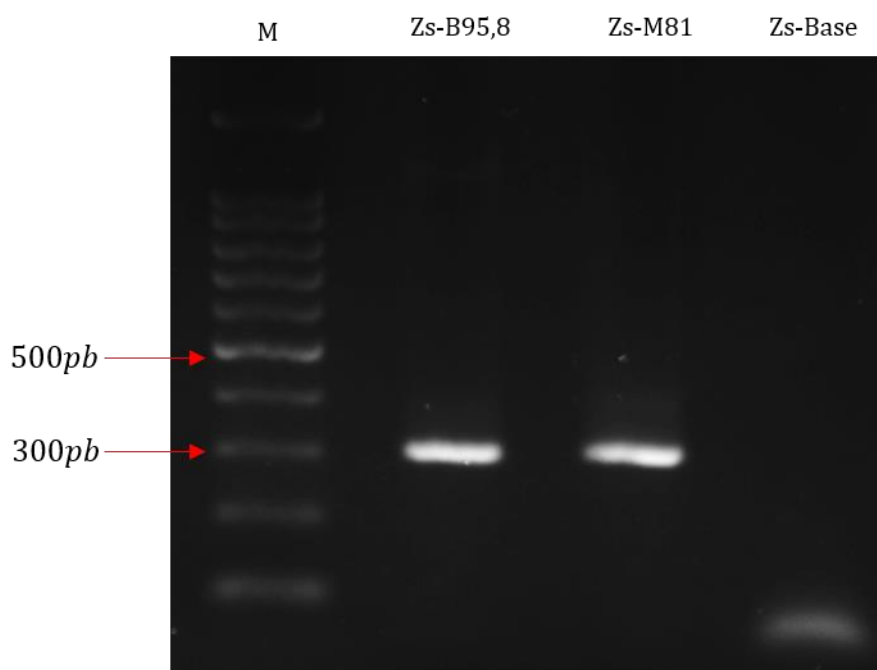


Figura 8 – Gel de eletroforese do produto de PCR realizada para verificação da presença da ORF da sequência viral codificadora de LMP1 nos construtos: Zs-B95.8 - ZsGreen-LMP1-B958; Zs-M81 - ZsGreen-LMP1-M81; Zs-Base - pEF1 α -IRES-ZsGreen. M – Marcador de número de pares de base.

A fim de confirmar a integridade estrutural e funcional dos vetores, seguiram-se experimentos iniciais de transfecção de células HEK293 visando identificação de fluorescência produzida pela GFP codificada nos vetores. As tentativas de se estabelecer linhagens transfectadas de forma estável para expressão constitucional de LMP1 não lograram êxito, resultado atribuído aos efeitos citotóxicos da expressão robusta da

oncoproteína viral (dado não mostrado). Optou-se então por realizar a transfecção transiente e seguimento dos experimentos em 72h pós-transfecção (pt). A Figura 9 ilustra o resultado obtido de transfecção de células HEK293 com os vetores indicados em 24h após o início dos experimentos.

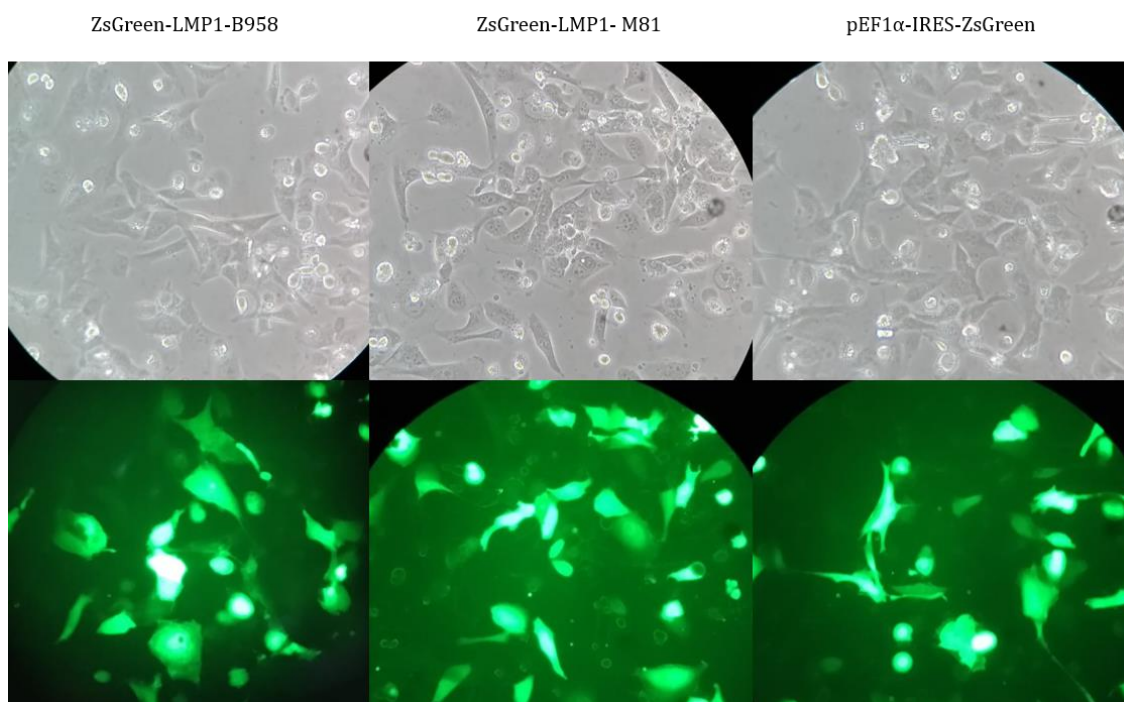


Figura 9 – Expressão da GFP 24h após a transfecção celular em células HEK293.

4.2 Detecção da expressão de EBV LMP1

Os resultados apresentados a seguir referem-se a um experimento realizado para analisar a viabilidade da aplicação de MS no contexto deste estudo e propor uma metodologia de análise para posterior aplicação na comparação entre os efeitos causados pela expressão de diferentes variantes da LMP1 em células HEK293. Dessa maneira, nos experimentos subsequentes foram submetidos apenas as proteínas extraídas das células transfectadas com o construto ZsGreen-LMP1-B958 (HEK293-LMP1-B958) e o vetor-base pEF1α-IRES-ZsGreen (HEK293-ZsGreen).

Após 72h de transfecção, as células foram coletadas para extração de RNA e produção do cDNA. Após reação de PCR, a amplificação de fragmentos com tamanho próximo a 200pb demonstra que a transcrição do gene da LMP1 nas células HEK293-LMP1-B958, evidenciado pela redução no tamanho do amplicon quando comparado

com a reação de amplificação do vetor ZsGreen-LMP1-B958 (Figura 10). Como era esperado, não houve amplificação nas células HEK293-ZsGreen.

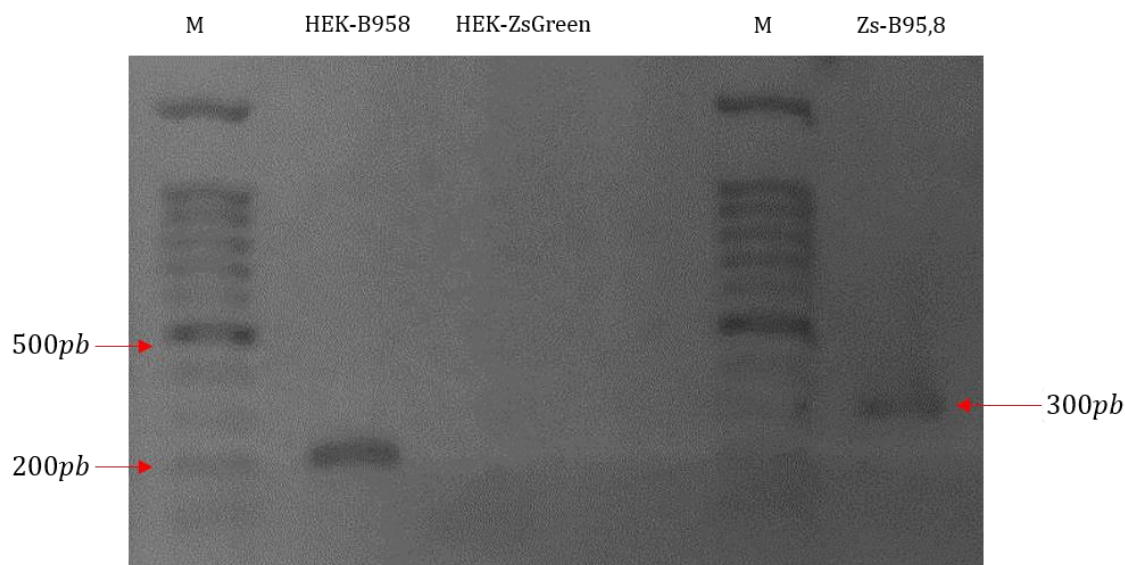


Figura 10 – Gel de eletroforese do produto de PCR realizada para verificação da presença do mRNA da LMP1 nas amostras transfectadas: HEK-B958 - Células HEK293 transfectadas com o vetor ZsGreen-LMP1-B958; HEK-ZsGreen - Células HEK293 transfectadas com o vetor-base pEF1 α -IRES-ZsGreen. Zs-B95.8 – Reação de amplificação do vetor ZsGreen-LMP1-B958. M – Marcador de número de pares de base. A redução do tamanho do amplicon comparando as amostras de cDNA e DNA evidenciam a expressão do mRNA da LMP1. Imagem com efeito negativo.

Após detecção do mRNA, células do mesmo lote experimental foram utilizadas na extração de proteínas totais. Após quantificação de proteínas totais, para certificação da integridade das amostras, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida previamente a submissão das amostras às análises de MS. A presença de bandas bem definidas na Figura 11 revelam a integridade das amostras viabilizando o prosseguimento experimento de MS.

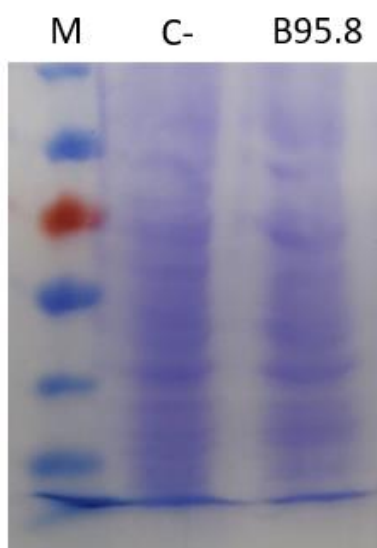


Figura 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas totais extraídas de células HEK293 transfectadas com o vetor-base (C-) ou com vetor para expressão da proteína LMP1 do EBV, variante B95.8. M – Marcador de peso molecular.

4.3 Identificação peptídica por Espectrometria de Massas

Proteínas totais das amostras foram submetidas a digestão por tripsinização, dessalinização, purificação e concentração dos peptídeos, para o sequenciamento por MS. Um total de 951 proteínas foram identificadas na amostra de células HEK293-LMP1-B95.8 após reconstrução computacional com software PatternLab (CARVALHO et al., 2016), em contraste com a detecção de 762 na amostra de células transfectadas com o vetor-base, sem a expressão de EBV LMP1 (HEK293-ZsGreen). Conforme demonstrado no diagrama de Venn a seguir (Figura 12), das 951 proteínas identificadas nas células expressando LMP1, 265 não foram encontradas no controle e 686 proteínas foram identificadas em ambas as amostras.

Análises funcionais das proteínas expressas em apenas um dos grupos (B95.8, expressam a variante B95.8 da LMP1, ou C-, controle negativo) utilizando a base de dados PANTHER (<https://pantherdb.org>) não revelaram grandes diferenças entre os grupos. A Figura 13 classifica as proteínas identificadas de acordo com a sua função molecular, o seu papel em processos biológicos e a classe a qual pertencem. A similaridade entre os perfis identificados nas três classificações demonstra que a não detecção de determinada proteína em um dos grupos não evidencia, necessariamente,

a influência da LMP1. Apesar disso, algumas proteínas identificadas apenas na presença da LMP1 merecem destaque devido a sua função (Quadro 1).

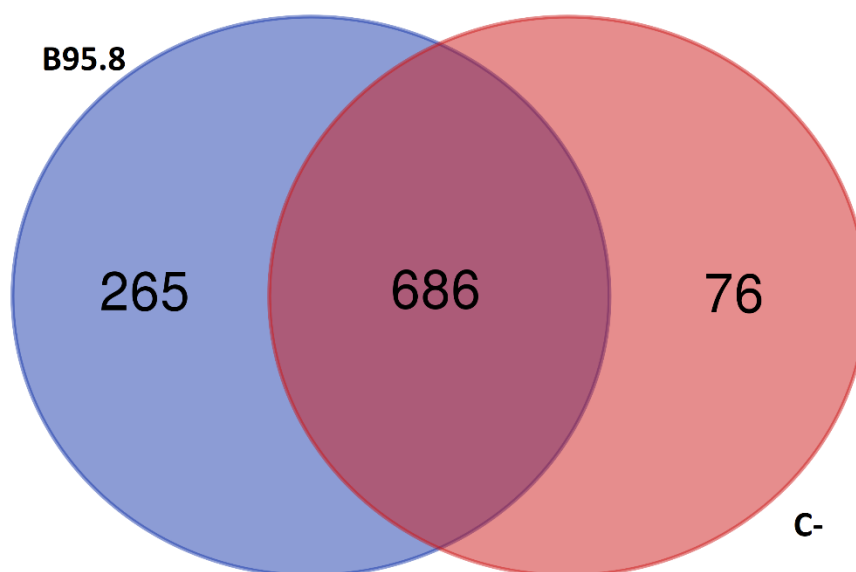


Figura 12 – Diagrama de Venn indicando a quantidade total de proteínas identificadas por MS em cada condição experimental e as compartilhadas entre as amostras avaliadas.

Análises de expressão diferencial (*Fold change* - FC) e testes T no conjunto de dados das proteínas presentes em ambos os grupos demonstraram 129 proteínas diferencialmente expressas na presença da LMP1 em relação ao vetor base, sendo 90 delas com FC superior a 2, que foi o limiar estabelecido para as análises (Taxa de descoberta falsa < 0.05). Dessas 90 proteínas diferencialmente expressas, 71 foram reguladas positivamente (*upregulated*) e 19 reguladas negativamente (*downregulated*), demonstradas no gráfico de vulcão (Figura 14). O mapa de calor (*heat map*) da Figura 15 demonstra as 50 proteínas com maior FC detectadas pela MS. O quadro 2 lista 5 proteínas que merecem destaque, positivamente reguladas na vigência da expressão da LMP1 do EBV genótipo B95.8.

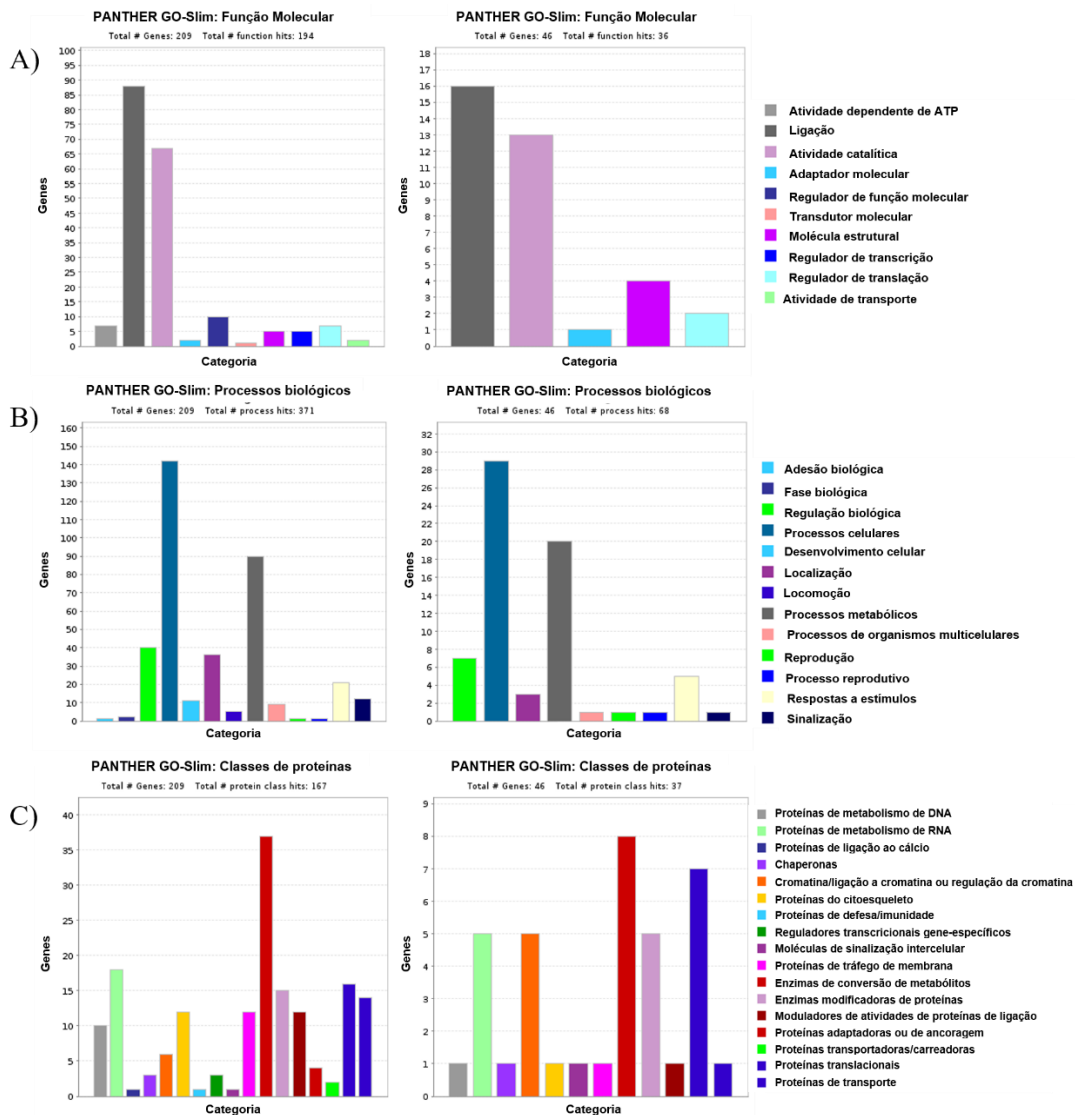


Figura 13 – Análises funcionais das proteínas identificadas por MS em apenas um dos grupos de estudo. Gráficos da esquerda referem-se as proteínas identificadas na presença de EBV LMP1-B95.8. Gráficos da direita referem-se as proteínas detectadas apenas no controle negativo. A – Proteínas classificadas de acordo com a sua função molecular. B – Proteínas classificadas de acordo com os processos biológicos nos quais estão envolvidas. C – Proteínas classificadas de acordo com a sua classe. Nota-se a similaridade entre os perfis.

Quadro 1 – Listagens de proteínas expressas apenas na presença de LMP1.

Código¹	Proteína	Gene (HGNC ID)²	Função
Q9NYF8	Fator de transcrição associado ao BCL-2	<i>BCLAF1</i> (HGNC:16863)	Repressão da apoptose (RADHA; RAGHAVAN, 2017)
Q07812	Regulador de apoptose BAX	<i>BAX</i> (HGNC:959)	Regulador central da via de sinalização da apoptose (PEÑA-BLANCO; GARCÍA-SÁEZ, 2018)
O14654	Substrato do receptor de insulina 4	<i>IRS4</i> (HGNC:6128)	Transmissão de sinais do ambiente extracelular para o ambiente intracelular através de receptores transmembrana (MACHADO-NETO et al., 2018)
F8WCF6	Subunidade 4 do complexo Arp2/Arp3	<i>ARPC4</i> (HGNC:707)	Componente de ligação de actina do complexo Arp2/3 (MOLINIE; GAUTREAU, 2018)

¹ Código UniProt de identificação de proteínas ([UniProt](#)) ² Código do gene de acordo com o comitê de nomenclatura de genes HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*)

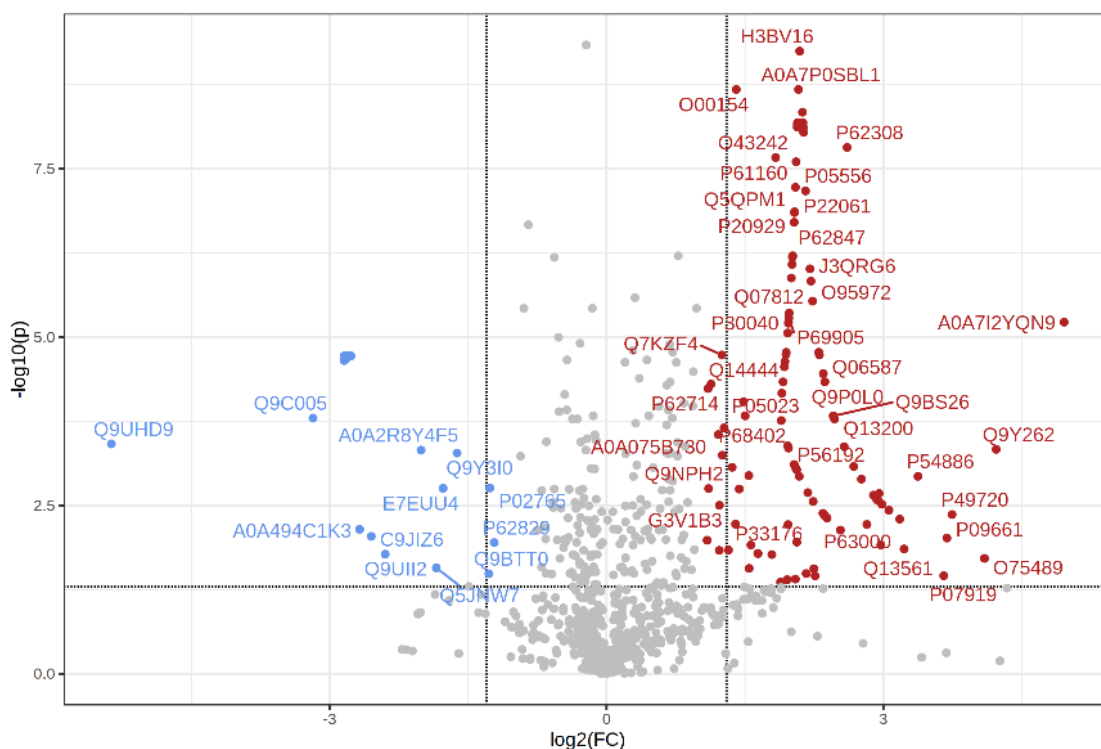


Figura 14 – Gráfico de vulcão (*Volcano Plot*) indicando as proteínas expressas diferencialmente em células expressando EBV LMP1 em relação ao vetor base. Células coletadas para extração de proteínas 72h após transfecção com os vetores ZsGreen-LMP1-B958 e pEF1 α -IRES-ZsGreen. Pontos vermelhos representam as proteínas positivamente reguladas e azuis as proteínas negativamente reguladas. Pontos cinzas não são estatisticamente significativos. Quanto mais longe da posição do (0,0), mais significativo é o resultado.

Quadro 2 – Listagens de proteínas, positivamente reguladas na presença da LMP1, selecionadas de acordo com sua função e relação com o EBV previamente descritas na literatura.

Código ¹	Proteína	Gene (HGNC ID) ²	FC ³
P63000	Proteínas rac1 de Ligação ao GTP	<i>RAC1</i> (HGNC:9801)	2.9743
P04637	Proteína supressora de tumor p53	<i>TP53</i> (HGNC:11998)	2.9539
P06493	Quinase 1 dependente de ciclina	<i>CDK1</i> (HGNC:1722)	2.8933
P05556	Integrina beta1	<i>ITGB1</i> (HGNC:6153)	2.0558
P61160	Proteína 2 relacionada a actina	<i>ACTR2</i> (HGNC:169)	2.0478

¹ Código UniProt de identificação de proteínas ([UniProt](http://www.uniprot.org/)) ² Código do gene de acordo com o comitê de nomenclatura de genes HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*); ³ FC: Nível de expressão diferencial (*Fold Change*).

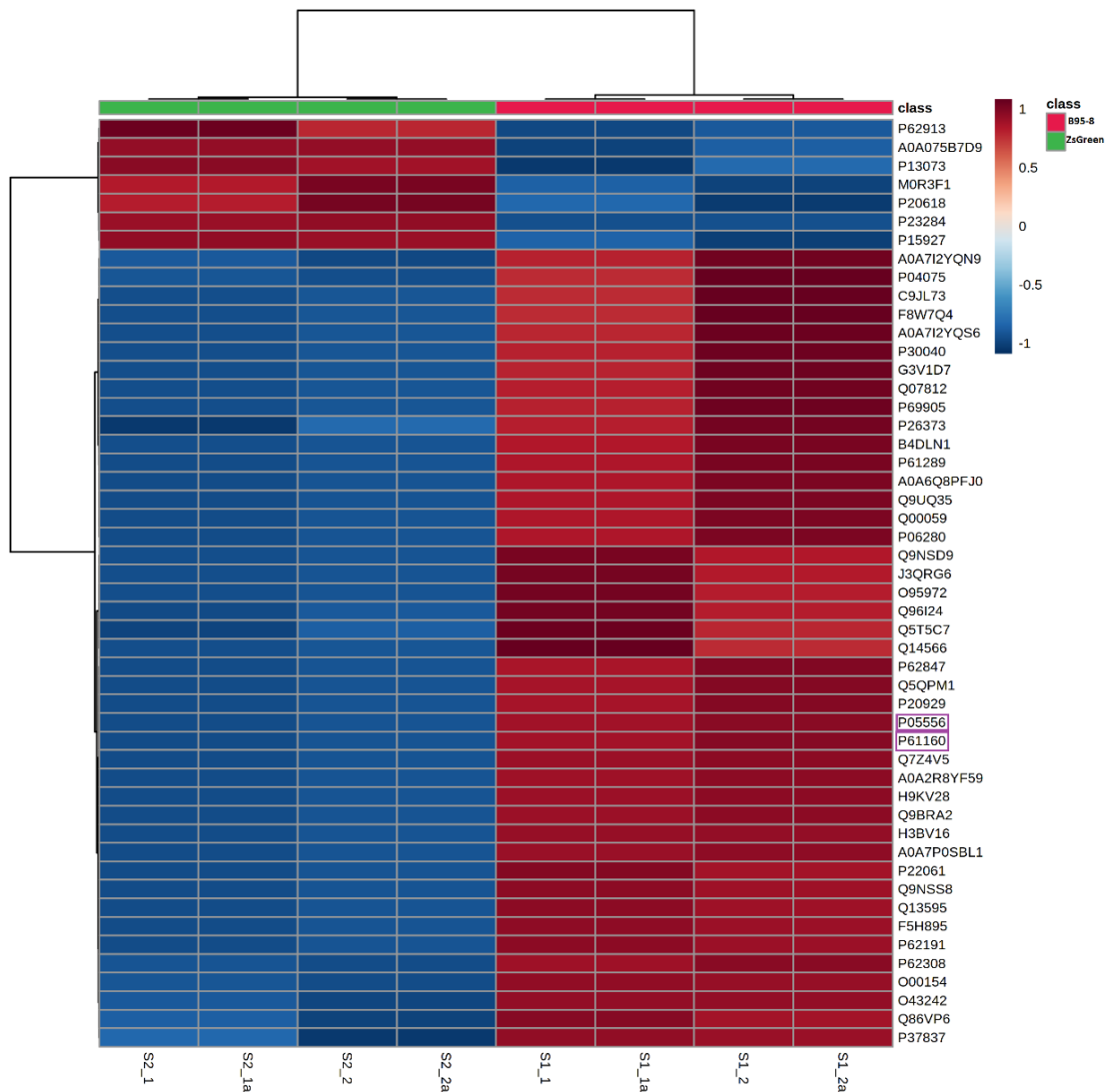


Figura 15 – Mapa de calor demonstrando a análise de agrupamentos para as proteínas diferencialmente expressas na presença de LMP1. Proteínas identificadas pelo Código UniProt ([UniProt](https://www.uniprot.org/)). Os códigos destacados referem-se a duas das proteínas selecionadas e descritas no quadro 2.

As proteínas destacadas no quadro 1 e 2 fazem parte de importantes vias de sinalização responsáveis por cascatas de eventos relevantes no processo de carcinogênese. A regulação positiva na expressão de tais proteínas na presença da LMP1 revela o potencial da oncoproteína na modulação de processos celulares que podem culminar na obtenção de fenótipos malignos para a célula.

5 Discussão

Os processos através dos quais a oncoproteína LMP1 interage com a célula hospedeira vem sendo elucidados e evidenciam a influência da proteína em uma vasta gama de processos biológicos por meio de interações diretas e indiretas com variadas vias de sinalização, levando a desregulação de um grande espectro de eventos em diferentes contextos celulares (WANG; NING, 2021).

A regulação positiva da Rac1 mediante expressão da LMP1 evidenciadas neste trabalho (FC de 2.9743), abrem uma vasta gama de possibilidades por meio das quais a oncoproteína pode regular processos biológicos associados a carcinogênese. Em células de NPC, foi demonstrado que a expressão de LMP1 se relaciona com a superexpressão de fibronectina que se associa com a aquisição de fenótipos mesenquimais mediante a transição epitelial-mesenquimal, sendo o aumento na expressão de fibronectina um indicativo de um prognóstico ruim em NPC (MA et al., 2014). Além disso, o aumento da mobilidade das células NPC, mediante expressão de LMP1 e regulação da fibronectina, é acompanhado de mudanças morfológicas em células de NPC, que apresentam um fenótipo mais alongado mediante translocação de Rac1 para a membrana (WANG et al., 2019). Rac1 é um membro da superfamília de proteínas Ativadores de GTP Fosfo-Hidrolase (*Small GTPases*) e apresenta funções essenciais em diversos aspectos da biologia celular, tanto em células normais, como cancerígenas (DE; ASKE; DEY, 2019).

Em outro contexto, sequenciamento de amostras de melanomas revelaram mutações nas proteínas Rac1 em 5 a 9% dos casos, levando a superexpressão de PD-L1, promovendo a supressão da resposta imune antitumoral (VU et al., 2015). Destaca-se a capacidade do EBV em modular a resposta imune do hospedeiro, por meio da regulação da expressão de PD-1 e seus ligantes (BIGGI; ELGUI DE OLIVEIRA, 2022).

A regulação mútua entre a LMP1 e a p53 pode apresentar um importante papel na latência do EBV e os cânceres relacionados, de maneira que a expressão diferencial da proteína supressora de tumor p53, com FC de 2.9539, aqui demonstrada é bastante relevante no contexto da carcinogênese mediada pelo EBV. O mecanismo por trás da superexpressão de LMP1 e sua relação com a proteína supressora tumoral p53 ainda não é bem definido (CHATTERJEE et al., 2019), mas foi demonstrado que a LMP1, por meio da expressão da Proteína 3 Induzida por Fator de Necrose Tumoral alfa (*Tumor*

necrosis factor alpha-induced protein 3 – TNFAIP3), bloqueia os estímulos apoptóticos ativados pela p53 em Carcinoma Pulmonar de Células não Pequenas (FRIES; MILLER; RAAB-TRAUB, 1996). Além disso, a expressão ectópica de p53 em condições de danos ao DNA estimula a expressão endógena de LMP1 mediante interação com o fator regulador de interferon 5 (*Interferon Regulatory Factor 5* – IRF5), um alvo da p53 que também se associa a LMP1. Subsequentemente, para o benefício do EBV, a LMP1 bloqueia a indução a apoptose estimulada devido a danos no DNA estimulada pela p53 e IRF5 (WANG et al., 2017).

A quinase dependente de ciclina 1 desempenha um papel fundamental no controle do ciclo celular eucariótico, modulando o ciclo dos centríolos, bem como o início mitótico; promove transição entre as fases G2-M e transição entre as fases G1-S do ciclo celular via associação com outras ciclinas (NAKAMURA et al., 2010; ZHANG et al., 2009), de maneira que a regulação positiva da CDK1 mediante expressão de LMP1 (FC de 2.8933) é digna de investigação.

Nesse sentido, o linfoma Nasal de Células T/Natural Killer (*Nasal natural killer/T-cell lymphoma* – NNKTL) apresenta características epidemiológicas, clínicas e histológicas distintas em comparação com outros linfomas malignos e é frequentemente associado ao EBV. A expressão aberrante de quinase 1 dependente de ciclina (*Cyclin-Dependent kinase 1* – CDK1) é uma característica de NNKTL. Foi demonstrado que o silenciamento da LMP1 leva a regulação negativa da CDK1 em NNKTL. Além disso, a inibição de CDK1 suprimiu significativamente o crescimento de NNKTL em um modelo xenográfico em camundongos (NAGATO et al., 2019). Adicionalmente, foi demonstrado que a LMP1 interage com a CDK2 na transformação de fibroblastos de roedores (EVERLY; MAINOU; RAAB-TRAUB, 2004), indicando que a interação entre a oncoproteína e a quinases dependentes de ciclina são um importante meio pelo qual a LMP1 exerce seu papel transformador e a detalhada investigação desses mecanismos moleculares pode ser valiosa.

A CDK1 também regula o destino de células que se apresentam presas em seu ciclo celular (*mytotic arrest*) mediante fosforilação das proteínas anti-apoptóticas Bcl-x(L) e Bcl-2, levando à perda de sua atividade antiapoptótica e consequente morte celular (SAKURIKAR; EICHHORN; CHAMBERS, 2012; TERRANO; UPRETI; CHAMBERS,

2010). A expressão da LMP1 em conjunto com a regulação positiva da CDK1 evidenciam uma complexa rede responsável pela regulação da sobrevivência celular deflagrada pelo EBV e destacam a importância da proteína viral BHRF1, homóloga à proteína antiapoptótica humana Bcl-2 (HENDERSON et al., 1993). Destaca-se ainda a identificação do fator de transcrição associado ao BCL-2 e do regulador de apoptose BAX somente nas amostras LMP1 positivas, indicando um papel crucial da LMP1 na imortalização e sobrevivência de células infectadas pelo EBV.

A regulação positiva da Integrina beta1 na presença da LMP1 (FC de 2.0558) pode indicar um mecanismo para estabelecer e garantir a persistência viral no hospedeiro, pois foi demonstrado que o aumento da expressão de Integrina beta1 aumenta a susceptibilidade de infecção de linfócitos B de memória pelo EBV (DORNER et al., 2010). Ademais, Integrinas beta1 podem promover a sobrevivência celular pela transdução de sinais pela ativação das vias FAK, Src, ERK-MAPK e PI3K/Akt. A sinalização dessas vias pela LMP1 por intermédio da ativação das Integrinas beta1 na superfície de células epiteliais levam ao processo de transição epitelial mesenquimal contribuindo para o potencial metastático de cânceres epiteliais (MORRIS et al., 2018).

O complexo Arp2/Arp3 é uma maquinaria molecular com diversas funções celulares críticas, incluindo fagocitose e tráfico vesicular. A subunidade 4 do complexo Arp2/Arp3 foi identificada apenas nas amostras onde havia a expressão de LMP1 e a regulação positiva da Proteína 2 relacionada a actina (*Actin Related Protein 2 – Arp2*) podem indicar uma modulação do complexo pelo EBV. Digno de nota, foi demonstrado que o complexo é explorado por vírus e bactérias durante processos de infecção (PIZARRO-CERDÁ et al., 2017) e as proteínas 2 e 3 relacionadas a actina (*Actin Related Protein 3 – Arp3*), subunidades do complexo, são superexpressas em uma variedade de cânceres. A expressão diferencial do complexo é associada a progressão e invasão tumoral, sendo a superexpressão das Arp2/Arp2 marcadores para a distinção de melanomas malignos (MOLINIE; GAUTREAU, 2018). Não existe, até o momento, uma relação entre o EBV e a modulação do complexo Arp2/Arp3, de maneira que a regulação positiva da subunidade Arp2 detectada pela MS mostra uma possível e interessante associação entre a infecção viral e a expressão do complexo. Porém, mais estudos são necessários para validar a existência dessa relação.

Digno de destaque, o substrato do receptor de insulina 4 (*Insulin Receptor Substrate 4 – IRS4*), detectado apenas na presença de LMP1 está associado a regulação dos níveis de ativação da via PI3K e o *knockdown* de IRS4 inibiu a proliferação celular em comparação com células que apresentam uma alta expressão do substrato (HOXHAI; DISSANAYAKE; MACKINTOSH, 2013). Além disso, foi demonstrado que IRS4 promove a progressão de Carcinoma Pulmonar de Células não Pequenas pela ativação das vias PI3K/Akt e Ras-MAPK. A depleção de IRS4 aumentou significativamente a sensibilidade de A549 de câncer de pulmão a droga *gefitinib* (HAO et al., 2021). Ademais, IRS4 induz a tumorigênese mamária e induz um fenótipo de resistência a terapias que tenham como alvo o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2 – HER2*) (IKINK et al., 2016). Ainda, o micro RNA miR-493 é regulado negativamente em células e tecidos provenientes de melanomas e a superexpressão do miR-493 em células A375 levou a regulação negativa do IRF4, inibindo a proliferação celular (CUI et al., 2017). Se confirmada a relação entre a expressão da LMP1 e a identificação do IRF4 (apesar de não existirem evidências da regulação do IRF4 pelo EBV até o momento), a interação pode representar um importante mecanismo do potencial tumorigênico do vírus.

Importante destacarmos que a expressão das proteínas em apenas um dos grupos, na presença ou ausência da LMP1, não pode ser interpretada como uma influência direta da oncoproteína pois a não identificação de determinada proteína pode representar apenas uma limitação na metodologia experimental adotada. Nesse sentido, uma alternativa para se observar o papel da LMP1, além das análises de expressão diferencial, seria realizar a coleta de células em diferentes intervalos de tempo (24h, 48h, 72h), podendo então identificar as mudanças de expressão ao longo do processo de transfecção celular. Além disso, não foi possível o estabelecimento de uma linhagem celular estável que expressasse constitutivamente a LMP1 devido ao significativo efeito citotóxico deflagrado pela expressão aberrante da proteína viral. Notadamente, os vetores selecionados para este trabalho não apresentam nenhum controle dos níveis de expressão, sendo a expressão promovida pelo promotor SV40 bastante robusta. Dessa maneira, análises futuras podem ser beneficiadas pela

utilização de vetores com a capacidade de regular os níveis de expressão e a possível obtenção de linhagens celulares estáveis que expressem LMP1.

6 Conclusões

As análises de MS identificaram proteínas conhecidamente reguladas pela LMP1 e evidenciaram possibilidades de novos alvos regulados pela proteína viral, se mostrando uma robusta técnica para se avaliar os efeitos da oncoproteína no complexo contexto biológico que é ocasionado mediante expressão da mesma.

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

1. A expressão da LMP1 em células humanas, *in vitro*, ainda que de modo transiente, modifica substancialmente a expressão de proteínas com reconhecido papel no desenvolvimento de cânceres humanos;
2. A técnica de MS revelou-se importante na análise de sistemas biológicos complexos, neste estudo aplicada para a análise do perfil global de expressão de proteínas na presença da EBV LMP1.
3. Com pequenos ajustes na metodologia, pode-se utilizar a técnica de MS para se interrogar acerca das diferenças deflagradas nos níveis de expressão de proteínas importantes mediante a expressão de variantes da LMP1.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, J. D. et al. Subtle Influence of ACE2 Glycan Processing on SARS-CoV-2 Recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 4, p. 166762, 17 dez. 2020.

ARABI, A. et al. Proteomic screen reveals Fbw7 as a modulator of the NF- κ B pathway. **Nature Communications**, v. 3, n. 1, p. 976, 31 jul. 2012.

ARCH, R. H.; GEDRICH, R. W.; THOMPSON, C. B. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. **Genes & Development**, v. 12, n. 18, p. 2821–2830, 15 set. 1998.

BANTSCHIEFF, M. et al. Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 255–265, mar. 2011.

BENEVENTO, M. et al. Proteome adaptation in cell reprogramming proceeds via distinct transcriptional networks. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 5613, 10 dez. 2014.

BIGGI, A. F. B.; ELGUI DE OLIVEIRA, D. The Epstein-Barr Virus Hacks Immune Checkpoints: Evidence and Consequences for Lymphoproliferative Disorders and Cancers. **Biomolecules**, v. 12, n. 3, p. 397, 4 mar. 2022.

CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 102–117, jan. 2016.

CHATTERJEE, K. et al. The interplay between Epstein-Bar virus (EBV) with the p53 and its homologs during EBV associated malignancies. **Heliyon**, v. 5, n. 11, p. e02624, nov. 2019.

COAN, B. G. M. **Efeitos da oncoproteína LMP1 do vírus de Epstein-Barr no potencial de invasão e na expressão de microRNAs endógenos em células humanas in vitro**. Text—[s.l.] Universidade Estadual Paulista (Unesp). Instituto de Biociências. Botucatu, 2016.

COHEN, J. I. Epstein–Barr Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 7, p. 481–492, 17 ago. 2000.

COHEN, J. I.; LEKSTROM, K. Epstein-Barr virus BARF1 protein is dispensable for B-cell transformation and inhibits alpha interferon secretion from mononuclear cells. **Journal of Virology**, v. 73, n. 9, p. 7627–7632, set. 1999.

CORNISH, T.; BRYDEN, W. Miniature Time-of-Flight Mass Spectrometer for a Field-Portable Biodetection System. **Johns Hopkins APL Tech Digest**, v. 20, 1 jul. 1999.

CUI, A. et al. Downregulation of miR-493 promoted melanoma proliferation by suppressing IRS4 expression. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 39, n. 5, p. 1010428317701640, maio 2017.

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

DE OLIVEIRA, D. E.; BALLON, G.; CESARMAN, E. NF-kappaB signaling modulation by EBV and KSHV. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 248–257, jun. 2010.

DE, P.; ASKE, J. C.; DEY, N. RAC1 Takes the Lead in Solid Tumors. **Cells**, v. 8, n. 5, p. E382, 26 abr. 2019.

- DEVERGNE, O. et al. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 12, p. 7098–7108, dez. 1996.
- DOLE, M. et al. Molecular Beams of Macroions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 49, n. 5, p. 2240–2249, 1 set. 1968.
- DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, n. 6, p. 1191–1308, jun. 1981.
- DORNER, M. et al. beta1 integrin expression increases susceptibility of memory B cells to Epstein-Barr virus infection. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6667–6677, jul. 2010.
- EPSTEIN, M. A.; ACHONG, B. G.; BARR, Y. M. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 7335, p. 702–703, 28 mar. 1964.
- ERSING, I. et al. A Temporal Proteomic Map of Epstein-Barr Virus Lytic Replication in B Cells. **Cell Reports**, v. 19, n. 7, p. 1479–1493, 16 maio 2017.
- EVERLY, D. N.; MAINOU, B. A.; RAAB-TRAUB, N. Induction of Id1 and Id3 by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and regulation of p27/Kip and cyclin-dependent kinase 2 in rodent fibroblast transformation. **Journal of Virology**, v. 78, n. 24, p. 13470–13478, dez. 2004.
- FRANZEN, J. Improved resolution for MALDI-TOF mass spectrometers: a mathematical study. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 164, n. 1, p. 19–34, 1 jun. 1997.
- FRIES, K. L.; MILLER, W. E.; RAAB-TRAUB, N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. **Journal of Virology**, v. 70, n. 12, p. 8653–8659, dez. 1996.
- GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 140–150, fev. 2003.
- GROSS, J. H. **Mass Spectrometry: A Textbook**. 2. ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011.
- HALE, O. J.; COOPER, H. J. In situ mass spectrometry analysis of intact proteins and protein complexes from biological substrates. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 1, p. 317–326, 28 fev. 2020.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.
- HAO, P. et al. IRS4 promotes the progression of non-small cell lung cancer and confers resistance to EGFR-TKI through the activation of PI3K/Akt and Ras-MAPK pathways. **Experimental Cell Research**, v. 403, n. 2, p. 112615, 15 jun. 2021.
- HENDERSON, S. et al. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 18, p. 8479–8483, 15 set. 1993.
- HOLZLECHNER, M.; EUGENIN, E.; PRIDEAUX, B. Mass spectrometry imaging to detect lipid biomarkers and disease signatures in cancer. **Cancer Reports (Hoboken, N.J.)**, v. 2, n. 6, p. e1229, dez. 2019.

- HONOUR, J. W. Benchtop mass spectrometry in clinical biochemistry. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 40, n. Pt 6, p. 628–638, nov. 2003.
- HOXHAI, G.; DISSANAYAKE, K.; MACKINTOSH, C. Effect of IRS4 levels on PI 3-kinase signalling. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73327, 2013.
- HUEN, D. S. et al. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF- κ B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. **Oncogene**, v. 10, n. 3, p. 549–560, 2 fev. 1995.
- IARC. **Biological Agents**. [s.l: s.n.].
- IKINK, G. J. et al. IRS4 induces mammary tumorigenesis and confers resistance to HER2-targeted therapy through constitutive PI3K/AKT-pathway hyperactivation. **Nature Communications**, v. 7, p. 13567, 23 nov. 2016.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. Acesso em: 7 fev. 2018.
- KAMRANVAR, S. A.; MASUCCI, M. G. Regulation of Telomere Homeostasis during Epstein-Barr virus Infection and Immortalization. **Viruses**, v. 9, n. 8, p. E217, 9 ago. 2017.
- KARAS, MICHAEL.; BACHMANN, DORIS.; HILLENKAMP, FRANZ. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 2935–2939, 1 dez. 1985.
- KARAS, MICHAEL.; HILLENKAMP, FRANZ. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299–2301, 15 out. 1988.
- KHAN, G.; HASHIM, M. J. Global burden of deaths from Epstein-Barr virus attributable malignancies 1990-2010. **Infectious Agents and Cancer**, v. 9, n. 1, p. 38, 2014.
- KICMAN, A. T.; PARKIN, M. C.; ILES, R. K. An introduction to mass spectrometry based proteomics-detection and characterization of gonadotropins and related molecules. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 260–262, p. 212–227, 2 jan. 2007.
- KIESER, A.; KAISER, C.; HAMMERSCHMIDT, W. LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. **The EMBO journal**, v. 18, n. 9, p. 2511–2521, 4 maio 1999.
- KUTOK, J. L.; WANG, F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. **Annual Review of Pathology**, v. 1, p. 375–404, 2006.
- LI, H. M. et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) upregulates Id1 expression in nasopharyngeal epithelial cells. **Oncogene**, v. 23, n. 25, p. 4488–4494, 27 maio 2004.
- LI, H.-P.; CHANG, Y.-S. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. **Journal of Biomedical Science**, v. 10, n. 5, p. 490–504, out. 2003.
- LO, A. K.-F. et al. The Role of EBV-Encoded LMP1 in the NPC Tumor Microenvironment: From Function to Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 640207, 2021.
- MA, L.-J. et al. Fibronectin overexpression is associated with latent membrane protein 1 expression and has independent prognostic value for nasopharyngeal carcinoma. **Tumor Biology**, v. 35, n. 2, p. 1703–1712, 1 fev. 2014.

- MACHADO-NETO, J. A. et al. Insulin Substrate Receptor (IRS) proteins in normal and malignant hematopoiesis. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 73, n. suppl 1, p. e566s, 11 out. 2018.
- MAINOU, B. A.; EVERLY, D. N.; RAAB-TRAUB, N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. **Oncogene**, v. 24, n. 46, p. 6917–6924, 20 out. 2005.
- MAINOU, B. A.; RAAB-TRAUB, N. LMP1 Strain Variants: Biological and Molecular Properties. **Journal of Virology**, v. 80, n. 13, p. 6458–6468, jul. 2006.
- MARCH, R. E. Quadrupole ion traps. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, n. 6, p. 961–989, dez. 2009.
- MASSON, G. R.; JENKINS, M. L.; BURKE, J. E. An overview of hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 10, p. 981–994, out. 2017.
- MATHIEU, É. Mémoire sur le mouvement vibratoire d'une membrane de forme elliptique. **Journal de Mathématiques Pures et Appliquées**, v. 13, p. 137–203, 1868.
- MECKES, D. G.; MENAKER, N. F.; RAAB-TRAUB, N. Epstein-Barr Virus LMP1 Modulates Lipid Raft Microdomains and the Vimentin Cytoskeleton for Signal Transduction and Transformation. **Journal of Virology**, v. 87, n. 3, p. 1301–1311, fev. 2013.
- MI, H. et al. Protocol Update for Large-scale genome and gene function analysis with PANTHER Classification System (v.14.0). **Nature protocols**, v. 14, n. 3, p. 703–721, mar. 2019.
- MILLER, W. E. et al. The NPC derived C15 LMP1 protein confers enhanced activation of NF-kappa B and induction of the EGFR in epithelial cells. **Oncogene**, v. 16, n. 14, p. 1869–1877, 9 abr. 1998.
- MOLINIE, N.; GAUTREAU, A. The Arp2/3 Regulatory System and Its Deregulation in Cancer. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 215–238, 1 jan. 2018.
- MOORE, K. W. et al. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 248, n. 4960, p. 1230–1234, 8 jun. 1990.
- MORRIS, M. A. et al. The EBV-Encoded Oncoprotein, LMP1, Induces an Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) via Its CTAR1 Domain through Integrin-Mediated ERK-MAPK Signalling. **Cancers**, v. 10, n. 5, p. E130, 1 maio 2018.
- MORRIS, M. A.; DAWSON, C. W.; YOUNG, L. S. Role of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1, LMP1, in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. **Future Oncology (London, England)**, v. 5, n. 6, p. 811–825, ago. 2009.
- MÜLLER COAN, B. G. et al. Latent Membrane Protein 1 (LMP1) from Epstein-Barr Virus (EBV) Strains M81 and B95.8 Modulate miRNA Expression When Expressed in Immortalized Human Nasopharyngeal Cells. **Genes**, v. 13, n. 2, p. 353, fev. 2022.
- MÜNZ, C. Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 691–700, nov. 2019.
- MURATA, T. et al. Molecular Basis of Epstein-Barr Virus Latency Establishment and Lytic Reactivation. **Viruses**, v. 13, n. 12, p. 2344, 23 nov. 2021.

- NAGATO, T. et al. Cyclin-dependent kinase 1 and survivin as potential therapeutic targets against nasal natural killer/T-cell lymphoma. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 99, n. 5, p. 612–624, maio 2019.
- NAKAMURA, A. et al. Mitotic phosphorylation of Aki1 at Ser208 by cyclin B1-Cdk1 complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 872–876, 19 mar. 2010.
- OH, J.-K.; WEIDERPASS, E. Infection and Cancer: Global Distribution and Burden of Diseases. **Annals of Global Health**, v. 80, n. 5, p. 384–392, 13 dez. 2014.
- PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388–W396, 2 jul. 2021.
- PEÑA-BLANCO, A.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. **The FEBS journal**, v. 285, n. 3, p. 416–431, fev. 2018.
- PIZARRO-CERDÁ, J. et al. The Diverse Family of Arp2/3 Complexes. **Trends in cell biology**, v. 27, n. 2, p. 93–100, 1 fev. 2017.
- PROSPERO, A. G. et al. Corona protein impacts on alternating current biosusceptometry signal and circulation times of differently coated MnFe₂O₄ nanoparticles. **Nanomedicine (London, England)**, v. 16, n. 24, p. 2189–2206, out. 2021.
- RADHA, G.; RAGHAVAN, S. C. BCL2: A promising cancer therapeutic target. **Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 1, p. 309–314, ago. 2017.
- RUBY, L. Applications of the Mathieu equation. **American Journal of Physics**, v. 64, n. 1, p. 39–44, 1 jan. 1996.
- SAKURIKAR, N.; EICHHORN, J. M.; CHAMBERS, T. C. Cyclin-dependent kinase-1 (Cdk1)/cyclin B1 dictates cell fate after mitotic arrest via phosphoregulation of antiapoptotic Bcl-2 proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 46, p. 39193–39204, 9 nov. 2012.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.
- SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D605–D612, 8 jan. 2021.
- TANAKA, K. et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151–153, 1988.
- TERRANO, D. T.; UPRETI, M.; CHAMBERS, T. C. Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 3, p. 640–656, fev. 2010.
- VAN DER PLAS-DUIVESTIJN, S. J. et al. Identifying Proteins in Zebrafish Embryos Using Spectral Libraries Generated from Dissected Adult Organs and Tissues. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 3, p. 1537–1544, 7 mar. 2014.
- VIEIRA, P. et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 4, p. 1172–1176, 15 fev. 1991.

- VU, H. L. et al. RAC1 P29S regulates PD-L1 expression in melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 28, n. 5, p. 590–598, 2015.
- WANG, L.; NING, S. New Look of EBV LMP1 Signaling Landscape. **Cancers**, v. 13, n. 21, p. 5451, 29 out. 2021.
- WANG, Q. et al. Tumor Suppressor p53 Stimulates the Expression of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1. **Journal of Virology**, v. 91, n. 20, p. e00312-17, 15 out. 2017.
- WANG, W.-Y. et al. Fibronectin promotes nasopharyngeal cancer cell motility and proliferation. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 109, p. 1772–1784, jan. 2019.
- WILM, M. Principles of electrospray ionization. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 10, n. 7, p. M111.009407, jul. 2011.
- WONG, K.-K.; ENGELMAN, J. A.; CANTLEY, L. C. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. **Current opinion in genetics & development**, v. 20, n. 1, p. 87, fev. 2010.
- WONG, Y. et al. Estimating the global burden of Epstein-Barr virus-related cancers. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 148, n. 1, p. 31–46, jan. 2022.
- WU, S. et al. LMP1 protein from the Epstein-Barr virus is a structural CD40 decoy in B lymphocytes for binding to TRAF3. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33620–33626, 30 set. 2005.
- ZHANG, B. et al. Clinical potential of mass spectrometry-based proteogenomics. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 16, n. 4, p. 256–268, abr. 2019.
- ZHANG, X. et al. Sequential phosphorylation of Nedd1 by Cdk1 and Plk1 is required for targeting of the gammaTuRC to the centrosome. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. Pt 13, p. 2240–2251, 1 jul. 2009.
- ZHANG, Z.-W. et al. Carboxyl terminal activating region 3 of latent membrane protein 1 encoded by the Epstein-Barr virus regulates cell proliferation and protein expression in NP69 cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 21, n. 2, p. 720–730, fev. 2020.

8 Anexos

Tabela 1 – Reagentes

Reagente	Empresa	N° Catálogo
2-Iodoacetamide	Sigma-Aldrich	161125
Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio-Rad	5000001
Complete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche	11873580001
Countess™ 3 FL Automated Cell Counter	Thermo Fisher Scientific	AMQAF2000
Dithiothreitol	Bio-Rad	161-0611
DMEM, powder, high glucose	Thermo Fisher Scientific	12100061
DNase I, Amplification Grade	Sigma-Aldrich	AMPD1-1KT
Fetal Bovine Serum	Sigma-Aldrich	F7524
Gel Loading Dye, Orange (6X)	New England Biolabs	B7022S
Gentamicin (10 mg/mL)	Thermo Fisher Scientific	15710064
GoScript™ Reverse Transcriptase	Promega	A5003
LB Agar, powder (Lennox L agar)	Thermo Fisher Scientific	22700041
Lipofectamine 3000 transfection reagent	Thermo Fisher Scientific	L3000015
Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base)™, powder	Thermo Fisher Scientific	12795084
Pierce™ C18 Spin Columns	Thermo Fisher Scientific	89870
Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity	Thermo Fisher Scientific	11304029
PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Fisher Scientific	K210006
Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set	Bio-Rad	5000207
RapiGest SF	Waters	186001861
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega	V5111
Trifluoroacetic acid	Sigma-Aldrich	302031
TRizol™ Reagent	Thermo Fisher Scientific	15596026
Vacufuge® Concentrator Plus	Eppendorf	EP5305000169