



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



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**“Efeitos da expressão do gene RPMS1 do vírus de  
Epstein-Barr em células humanas cultivadas *in vitro*”**

**BEATRICE ADRIANNE SILVA JORGE**

**Acadêmica**

**DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA, PH.D.**

**Orientador**

**Ethel Cesarman, M.D., Ph.D.**

**Co-orientadora**

Dissertação de defesa de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB). Trabalho desenvolvido junto ao [ViriCan](#), grupo de pesquisa do Instituto de Biotecnologia (IB-TEC) e Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

**Botucatu, SP**

**dezembro de 2020**

**“Efeitos da expressão do gene RPMS1 do vírus de  
Epstein-Barr em células humanas cultivadas *in vitro*”**

**BEATRICE ADRIANNE SILVA JORGE**

**Acadêmica**

**DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA, PH.D.**

**Orientador**

**Ethel Cesarman, M.D., Ph.D.**

**Co-orientadora**

Dissertação de defesa de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB). Trabalho desenvolvido junto ao [ViriCan](#), grupo de pesquisa do Instituto de Biotecnologia (IB-TEC) e Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

**Botucatu, SP**

**dezembro de 2020**

---

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

Jorge, Beatrice Adrienne Silva.

Efeitos da expressão do gene RPMS1 do vírus de  
Epstein-Barr em células humanas cultivadas in vitro /  
Beatrice Adrienne Silva Jorge. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

Coorientador: Ethel Cesarman

Capes: 40101045

1. Nasofaringe - Câncer. 2. Linfoma. 3. Carcinogênese.  
4. Técnicas in vitro. 5. Herpesvírus humano 4.

Palavras-chave: Carcinogênese; Carcinoma de nasofaringe;  
EBV; Epstein-Barr; Linfomas.

*Se isso não te faz mais sábio,*

*Não te torna mais forte,*

*Não faz você viver um pouco mais*

*O que você está fazendo?*

*(Zola Jesus – Wiseblood)*

---

## **Agradecimentos**

O presente trabalho, cuja citação é apresentada abaixo, foi financiado com recursos provenientes do processo 2018/12164-1 (bolsa de mestrado), e processo 2019/05061-4 (BEPE), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), no âmbito do Convênio celebrado pela FAPESP com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para concessão de bolsas em Instituições públicas e privadas sem fins lucrativos de ensino superior do Estado de São Paulo. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e da CAPES.

SILVA JORGE, B. A. **Efeitos da expressão do gene RPMS1 do vírus de Epstein-Barr em células humanas cultivadas *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2020. 60p

---

## Agradecimentos

Quase três anos de mestrado, muitas emoções e nada disso teria feito sentido sem o apoio de vocês.

- Agradeço ao grupo que pertenço, Virican, por possuir membros que sempre se apoiam e se respeitam.
  - Ao meu orientador Deilson Elgui de Oliveira por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesma. Na graduação ouvi uma frase que me marcou: escolha bem o seu primeiro orientador, pois ele vai influenciar como você será como profissional. Fico muito feliz e satisfeita pelo senhor ter sido meu primeiro orientador. Obrigada pela oportunidade de passar tanto os anos da minha IC como do mestrado no Virican e dividir comigo tantos ensinamentos. Acredito que isso me tornou uma pessoa capaz de enfrentar qualquer desafio científico.
  - Meus colegas de grupo, Barbara e Brunno por serem as autoridades nos experimentos que realizamos e sempre estarem dispostos a me ajudar e tirar dúvidas.
  - Brayan, como eu havia dito “não existiria final de mestrado sem você”. Sou imensamente grata ao quanto você me ajudou nos experimentos finais, mas sou mais grata ainda pela pessoa que você é e pelas nossas conversas.
  - César, minha eterna dupla da RPMS1. Obrigada por me ajudar em todas as diluições nesses três anos e ser meu parceiro de projeto.
  - Felipe e Viviana, meus “Viri Babies”, as idas ao laboratório não teriam vida nenhuma sem a presença de vocês. Obrigada por estarem comigo tanto na vida profissional quanto na pessoal. Vocês estarão sempre comigo!
  - À minha co-orientadora Ethel Cesarman e todos do seu laboratório na Weill Cornell que me receberam tão bem quando eu era mulher brasileira em Nova Iorque.
  - À minha família de Botucatu, as meninas da Pensão da Teresão e a própria Dona Teresa. Nada foi melhor do que chegar em casa e ouvir vocês contarem suas histórias e seus planos. Vocês são incríveis!
  - Aos meus divertidamentes! Começando por Robinson (Crusoé), obrigada por todas as conversas filosóficas e músicas estranhas que me acompanharam nos experimentos e escrita da dissertação.
  - Giovanna, da graduação ao infinito. Não sei como duas pessoas tão diferentes são tão amigas, mas agradeço todos os dias por isso.
-

- Felipe (Partoba), não consigo nem mensurar o quão você foi a peça chave em diversos momentos da minha vida. Meu eterno companheiro, que me faz crescer a cada conversa e me leva ao cinema sempre que pode.
  - Fernanda, eu conseguiria escrever uma dissertação só sobre você e nossa amizade. Quando eu me mudei para Botucatu e falava que odiava, minha psicóloga disse que era porque eu ainda não havia criado raízes. Quem iria imaginar que eu não só criaria raízes, mas uma árvore enorme que você me ajudou a regar todos os dias. Minha irmã e melhor amiga, esse mestrado eu divido com você!
  - Minha família, que sempre me apoiou e me deu suporte em todos os momentos. Meu pai, Paulo, que me ensinou desde pequena que pessoas inteligentes são aquelas que estudam diversos assuntos e que indiretamente me influenciou para carreira acadêmica, pois quero ser uma pessoa inteligente e nunca deixar de estudar. Minha irmã, Heloice, que apesar de dragãozinho, eu sei que me ama. E principalmente minha mãe, Sandra. Não seria a pessoa que sou sem a senhora, minha eterna pessoa-modelo e quem eu quero ser quando crescer.
  - À minha avó Yvone, por todas as comidas que fez para mim durante todos esses anos e por sempre me ligar perguntando se eu estava bem
  - Àquele que fez com que tudo isso fosse possível, materialmente e emocionalmente, meu avô Eurico. Não só pelo apoio financeiro que me fez ser biomédica e enfrentar os primeiros meses de mestrado sem bolsa, mas pelo maior ensinamento de todos: não querer que coisas que eu nunca fiz deem certo na primeira tentativa. Porque ciência e a vida é uma eterna tentativa. Eu precisava de alguém para me lembrar disso e o senhor sempre esteve lá. Conheço muitos acadêmicos, mas nada supera a sabedoria da sua experiencia.
  - Por fim, todos que ajudaram indiretamente. Professores que complementaram minha formação, aos servidores por manterem as condições de trabalho, aos colegas de outros laboratórios que sempre socorreram quando um reagente acabava, aos meus amigos de São Paulo e meus demais familiares.
-

---

---

**“Efeitos da expressão do gene RPMS1 do vírus de  
Epstein-Barr em células humanas cultivadas *in vitro*”**

**Sumário**

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. RESUMO .....</b>                                                  | <b>14</b> |
| <b>2. ABSTRACT .....</b>                                                | <b>15</b> |
| <b>3. INTRODUÇÃO.....</b>                                               | <b>16</b> |
| 3.1 Infecção e Câncer .....                                             | 16        |
| 3.2 Vírus de Epstein-Barr.....                                          | 17        |
| 3.2.1 Generalidades .....                                               | 17        |
| 3.2.2 Ciclo biológico do EBV .....                                      | 18        |
| 3.2.3 Oncogenicidade do EBV.....                                        | 20        |
| 3.3 Proteína RPMS1 do EBV .....                                         | 21        |
| <b>4. OBJETIVOS .....</b>                                               | <b>23</b> |
| 4.1 Objetivo geral .....                                                | 23        |
| 4.2 Objetivos específicos .....                                         | 23        |
| <b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                       | <b>24</b> |
| 5.1 Cultura celular.....                                                | 25        |
| 5.2 Produção de vetores para expressão de EBV RPMS1 .....               | 27        |
| 5.3 Transdução lentiviral .....                                         | 30        |
| 5.4 Ensaio de viabilidade celular e migração .....                      | 31        |
| 5.5 Genotipagem e expressão do mRNA de EBV RPMS1 .....                  | 33        |
| 5.6 Repressão de EBV RPMS1 por RNAi.....                                | 35        |
| 5.7 Análise dos resultados.....                                         | 36        |
| <b>6. RESULTADOS .....</b>                                              | <b>37</b> |
| 6.1 Preâmbulo .....                                                     | 37        |
| 6.2 Geração dos construtos para transdução lentiviral de EBV RPMS1..... | 37        |
| 6.3 Produção e validação de partículas lentivirais em HEK293FT .....    | 42        |
| 6.4 Ensaios de viabilidade celular e migração .....                     | 47        |
| 6.5 Genotipagem e expressão da RPMS1 em linhagens linfoides .....       | 49        |
| 6.6 Avaliação da repressão de RPMS1 por dsRNA.....                      | 51        |
| <b>7. DISCUSSÃO.....</b>                                                | <b>54</b> |
| <b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                     | <b>57</b> |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                              | <b>58</b> |

---

---

## Lista de Abreviações

| <b>Acrônimo</b>          | <b>Definição por extenso</b>                                                       | <b>Correspondente em inglês (quando couber)</b>                               |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>18S</b>               | RNA ribossomal 18S                                                                 | <i>18S ribosomal RNA</i>                                                      |
| <b>BART/<br/>BamHI-A</b> | Transcritos à montante de BamHI-A                                                  | <i>BamHI-A rightward transcripts</i>                                          |
| <b>BALF2</b>             | Proteína ligadora de DNA fita simples                                              | <i>Single-stranded DNA binding protein</i>                                    |
| <b>BALF5</b>             | Subunidade catalítica da DNA polimerase                                            | <i>DNA polymerase catalytic subunit</i>                                       |
| <b>BL</b>                | Linfoma de Burkitt                                                                 | <i>Burkitt Lymphoma</i>                                                       |
| <b>CBF1/RPBJ</b>         | Proteína de ligação para sinal de recombinação da região kappa J da imunoglobulina | <i>Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin kappa J region</i> |
| <b>CR2/CD21</b>          | Receptor para fragmento 2 do complemento                                           | <i>Complement Receptor 2</i>                                                  |
| <b>DLBCL</b>             | Linfoma difuso de grandes células B                                                | <i>Diffuse Large B Cell Lymphoma</i>                                          |
| <b>DNA</b>               | Ácido desoxirribonucleico                                                          | <i>Deoxyribonucleic acid</i>                                                  |
| <b>DPBS</b>              |                                                                                    | <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>                                   |
| <b>DsiRNA</b>            |                                                                                    | <i>Dicer small-interference RNA</i>                                           |
| <b>EBER</b>              | Pequenos RNAs codificados pelo Vírus de Epstein-Barr                               | <i>Epstein-Barr virus-encoded small RNAs</i>                                  |
| <b>EBNA</b>              | Antígeno nuclear do vírus de Epstein-Barr                                          | <i>Epstein-Barr Nuclear Antigen</i>                                           |
| <b>EBV</b>               | Vírus de Epstein-Barr                                                              | <i>Epstein-Barr virus</i>                                                     |
| <b>FBS</b>               | Soro fetal bovino                                                                  | <i>Fetal bovine serum</i>                                                     |
| <b>GC</b>                | Adenocarcinomas gástricos                                                          | <i>gastric adenocarcinoma</i>                                                 |
| <b>HIV</b>               | Vírus da imunodeficiência adquirida humana                                         | <i>Human Immunodeficiency Virus</i>                                           |
| <b>HPRT</b>              | Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase                                        | <i>Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase</i>                         |
| <b>HPV</b>               | Vírus do papiloma humano                                                           | <i>Human papillomaviruses</i>                                                 |
| <b>HSP90</b>             | Proteína 90 de choque térmico                                                      | <i>Heat shock protein 90</i>                                                  |
| <b>HTLV</b>              | Vírus linfotrópico de células T humanas                                            | <i>Human T-lymphotropic virus</i>                                             |
| <b>IGF1</b>              | Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1                                  | <i>Insulin-like growth factor 1</i>                                           |
| <b>IKK</b>               | Quinase IKappaB                                                                    | <i>I kappa B kinase</i>                                                       |
| <b>KSHV</b>              | Vírus do sarcoma de Kaposi                                                         | <i>Kaposi Sarcoma Virus</i>                                                   |
| <b>LMP</b>               | Proteína latente de membrana                                                       | <i>Latent Membrane Protein</i>                                                |
| <b>MHC</b>               | Complexo principal de histocompatibilidade                                         | <i>Major Histocompatibility Complex</i>                                       |
| <b>NF-kB</b>             | Fator nuclear kappa B                                                              | <i>Nuclear Factor Kappa B</i>                                                 |
| <b>NPC</b>               | Carcinoma de nasofaringe                                                           | <i>Nasopharyngeal Carcinoma</i>                                               |

---



---

|                               |                                                |                                                              |
|-------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <b>ORF</b>                    | Quadros abertos para leitura                   | <i>Open Reading Frame</i>                                    |
| <b>RNA</b>                    | Ácido ribonucleico                             | <i>Ribonucleic acid</i>                                      |
| <b>SNP</b>                    | Polimorfismo de nucleotídeo único              | <i>Single nucleotide polymorphisms</i>                       |
| <b>RTPCR/qPCR</b>             | PCR quantitativa em tempo real                 | <i>Quantitative real-time PCR</i>                            |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | Fator de crescimento tumoral beta              | <i>Tumor Growth Factor Beta</i>                              |
| <b>TNF</b>                    | Fator de necrose tumoral                       | <i>Tumor Necrosis Factor</i>                                 |
| <b>TNFAIP3/A20</b>            | -                                              | <i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 or A20</i> |
| <b>TRAFs</b>                  | Receptor associado do fator de necrose tumoral | <i>Tumor necrosis factor receptor-associated factors</i>     |

---

## Figuras, Quadros e Tabelas

- FIGURA 1** – Delineamento geral do estudo. As etapas do projeto foram divididas em A, B e C. As etapas A e C foram realizadas no laboratório do Virican, a etapa B foi realizada majoritariamente no laboratório pertencente a Weill Cornell e partes no Virican. ....24
- Figura 2** - Eletroforese em gel de agarose 2% com produto de PCR da *ORF* de RPMS1 amplificada a partir da linhagem EBV positiva IBL1. O gel apresenta banda com tamanho predito para a *ORF* RPMS1 (313 bp). Amostra não contendo material amplificável é representada por NTC. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*. ....37
- Figura 3** - Eletroforese em gel de agarose 2% com produto de PCR da ligação de RPMS1 com o vetor pENTR/SD/D-TOPO. O gel apresenta banda com tamanho predito para a *ligação* (659 bp). Amostra não contendo material amplificável é representada por NTC. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*. ....38
- Figura 4** - Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da PCR de colônia para validação de transformação bacteriana com o construto pENTR/SD/D-TOPO-EBV\_RPMS1. **(A)** Resultado de eletroforese no qual uma colônia selecionada apresenta banda discreta indicando presença do construto. **(B)** As colônias 2, 7 e 11 apresentam amplificação de segmento de 659pb, consistente com o tamanho esperado para presença do inserto no vetor. Amostra não contendo material amplificável é representada por NTC. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*. ....38
- Figura 5** - Na imagem, as sequências C-terminal **(A)** e N-terminal **(B)** da sequência de RPMS1 confirmam a posição correta do inserto no vetor pENTR/SD/D-TOPO-EBV\_RPMS1. O alinhamento das sequências obtidas por sequenciamento Sanger foi efetuado no programa Geneious v2009.2.1 (BioMatters Inc., Auckland, NZ) a partir de sequência de referência publicada na literatura <sup>[55]</sup>. CDS – região de codificação. ....39
- Figura 6** - Eletroforese em gel de agarose 1% de produto de PCR colônia para validação de transformação bacteriana utilizando o construto pLenti6.3/TO/RPMS1. As colônias apresentam bandas inespecíficas e inconsistentes com tamanho esperado do inserto (2626 bp). Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*. Marcador *1kb Plus DNA* (Thermo Fisher). ....40
- Figura 7** - Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR do vetor purificado pLenti6.3/TOR/RPMS1 demonstra presença da *ORF* de RPMS1 confirmada pelos iniciadores RPMS1.S e RPMS1.A (342 pb). O conjunto de iniciadores CMV.S e V5C.AS apresenta anelamento inespecífico na sequência do vetor, amplificando fragmentos de tamanho variado. O conjunto de iniciadores CMV.S e WPRE.AS confirma a presença do inserto na posição e frame correto do sítio de clonagem (700 pb). Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*. .41

**Figura 8** – Alinhamento de sequências obtidas após sequenciamento do construto pLenti6.3/TO/RPMS1. No painel está apresentado o segmento correspondente a porção C-terminal na ORF de EBV RPMS1. Imagem gerada com software Geneious v2009.2.1 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zeland). .....42

**Figura 9 - (A)** Células HEK293FT 24h pós-transfecção com os vetores pLenti6.3/TO/RPMS1, pLP1, pLP2, pLP/VSVG e pLenti3.3/TR. A expressão do vetor de empacotamento pLP/VSVG proporciona fusão citoplasmática e formação de sincícios celulares, como observado na seta vermelha. **(B)** 72h pós-transfecção é possível observar algumas células entrando em apoptose (seta vermelha) devido a produção das partículas virais. Microscopia óptica de contraste de fase em microscópio invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). Magnificação de 200x. ....42

**Figura 10** - Células NP69 sem o vetor pLenti6.3/TO/RPMS1 e tratadas com doses crescentes de blasticidina, apresentando mudança de morfologia e densidade celular. **(A)** Blasticidina a 1µg/µl; é notada alteração de morfologia celular **(B)** Blasticidina 2,5µg/µl; observa-se redução no número de células e aumento de *debris* celular. **(C)** Blasticidina 3µg/µl; ausência de células viáveis. Microscopia óptica de contraste de fase em microscópio invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). Aumento final de 200x. ....43

**Figura 11** - Células NP69 transduzidas com o vetor pLenti6.3/TO/RPMS1 e tratadas com doses crescentes de blasticidina, apresentando mudança de morfologia e densidade celular. . **(A)** Blasticidina a 1µg/µl; é notada alteração de morfologia celular **(B)** Blasticidina 2,5µg/µl **(C)** Blasticidina 3µg/µl; **(D)** Blasticidina 3µg/µl; dois dias após o aumento da dose. **(E)** Blasticidina 3µg/µl; seis dias após o aumento da dose, já é observado o retorno do fenótipo natural da célula. **(F)** Blasticidina 3µg/µl; vinte e um dias após o aumento da dose, é visto que as células continuaram a apresentar formato similar ao natural. Microscopia óptica de contraste de fase em microscópio invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). Aumento final de 200x em A,B e C e 100x em D,E e F. ....43

**Figura 12** - Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR da extração de DNA das células NP69 transduzidas com o vetor pLenti6.3/TOR/RPMS1, confirmada a presença do vetor pelos iniciadores CMV.S e WPRE.A (700 pb). Controle positivo é a amostra do midiPrep do vetor. Controle negativo indicado por NTC. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*. ....44

**Figura 13** - Após a transdução em células NP69 do vetor induzível pLenti6.3/TOR/RPMS1 e o tratamento com as diferentes doses de tetraciclina, foi realizada a amplificação por PCR do cDNA obtido, e o produto da reação está apresentado na eletroforese em gel de agarose 1% . Foi observado que diferentes doses e mesmo sem o tratamento, as células não apresentaram

expressão da RPMS1. Controle negativo apresentado como NTC. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*.....44

**Figura 14** – Células NP69 transduzidas com o vetor pLenti6.3/TO/RPMS1 e tratadas com blasticidina 3µg/µl. Pannel à esquerda, células NP69 transduzidas e tratadas com blasticidina no primeiro dia e dez dias depois da exposição ao antibiótico, apresentam a mesma morfologia nos dois momentos. No pannel à direita, imagens do controle no primeiro e decimo dia após seleção com blasticidina, as células não transfectadas não sobreviveram a exposição pelo antibiótico. Microscopia óptica de contraste de fase em microscópio invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments). Aumento final de 100x. ....45

**Figura 15** - Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR da extração de RNA das células NP69 transduzidas com o vetor pLenti6.3/TOR/RPMS1, não apresentando expressão da RPMS1. Amostra de IBL1 utilizada como controle positivo. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*. ....46

**Figura 16** – Representação do gene da RPMS1 demonstrando as anotações dos primers das condições 1 e 2. **A** – Sequencia completa do gene da RPMS1 contendo as anotações dos 7 éxons e da ORF do gene. **B**- Sequencia ampliada em que o iniciador da condição 1 não anela à ORF da RPMS1. Mapa criado pelo SnapGene Viewer 5.0.2 (GSL Biotech LLC, CA, EUA).....46

**Figura 17** - Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR da extração de RNA das células NP69 transduzidas com o vetor pLenti6.3/TOR/RPMS1 do primeiro e do segundo experimento, NP69-T1 e NP69-T2, respectivamente. Com a utilização do novo par de primers foi possível detectar expressão de RPMS1 no primeiro experimento. Amostra de IBL1 utilizada como controle positivo. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*. ....47

**Figura 18** - Avaliação da expressão de RPMS1 em células NP69 transfectadas com diferentes concentrações de vetor pcDNARPMS1\_flag após 24h. Os resultados das condições indicadas foram avaliados teste Dunn's demonstrando que houve diferença estatística na expressão de RPMS1 entre os grupos de 500ng e 1500ng, sendo  $p < 0,05$  (\*). Gráfico gerado com software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).....48

**Figura 19** - Avaliação da viabilidade celular em células NP69 transfectadas por diferentes concentrações de vetor pcDNARPMS1\_flag após 24h. O ensaio foi realizado em triplicatas e normalizado utilizando a amostra controle como referência. Os resultados das condições indicadas foram avaliados pelo teste Dunn's comparando o controle com tratados (500ng, 1000ng e 1500ng). A figura mostra que houve diminuição de viabilidade celular nos grupos tratados com 1000ng e 1500ng, sendo valor de  $p < 0,05$  (\*). Não há diferença estatística quando comparados os tratamentos entre eles. Gráfico gerado com software GrathPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). ....48

**Figura 20** - Avaliação da taxa de migração celular de células NP69 transfectadas por diferentes concentrações de vetor pcDNARPMS1\_flag após 24h. O ensaio foi realizado em triplicatas. Os resultados das condições indicadas foram avaliados teste Dunn's comparando os grupos tratados entre si. O gráfico mostra que não houve diferença estatística no número de células que migraram. Gráfico gerado com software GrathPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).....49

**Figura 21** - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR para amplificação de segmento da ORF para EBV RPMS1 para confirmar sua presença em contexto genômico viral em linhagens de células linfoides constitutivamente infectadas pelo EBV. O amplicon obtido nesse experimento foi sequenciado para genotipagem do SNP 155391 de EBV RPMS1. Coloração com SYBER safe DNA (Thermo Fisher).....49

**Figura 22** – Alinhamento das sequencias amplificadas de segmento da ORF de RPMS1 do EBV nas linhagens de células linfoides indicadas, constitutivamente infectadas pelo vírus. O destaque indica a região do SNP 155391 de RPMS1. A de referência está publicada na literatura [55]. Alinhamento gerado com software GeneStudio v2.2 (GeneStudio Professional Edition).50

**Figura 23** - Expressão de EBV RPMS1 em nível transcricional avaliada por qPCR em células linfoides constitutivamente infectadas pelo EBV. A expressão de RPMS1 foi normalizada em relação aos transcritos dos genes que codificam a subunidade ribossomal 18S e proteína HSP90; o nível de expressão de RPMS1 em células IBL1 foi utilizado como referência. **A-** Resultados de três experimentos independentes, apresentados com médias e desvios padrão das triplicatas biológicas de cada linhagem celular. Amostras indicadas pela letra “a” não apresentam diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ; teste de Dunn). A letra “b” indica linhagens que não apresentam diferenças entre si, mas que diferem em relação às linhagens marcadas com a letra “c” ( $p < 0,05$ ; teste de Dunn). Gráfico gerado com software GrathPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). **B-** Quadro apresentando o *Fold Change* da três replicatas utilizadas na elaboração do gráfico.....50

**Figura 24** – Análise da expressão de EBV RPMS1 (gráficos à esquerda) e *HPRT* (gráficos à direita) em nível transcricional por qPCR nas linhagens linfoides IBL1 e Raji após transfecção com dsRNAs específicos para os alvos indicados. **A** - células IBL1 tratadas com 200nM e 100nM de dsRNA tendo como alvo a RPMS1 (dsiRPMS1.1 e dsiRPMS1.2), o controle positivo dsiHPRT, um controle negativo e uma condição na qual nenhum dsRNA foi transfectado. **B** - Células Raji tratadas com 200nM e 100nM de dsRNA tendo como alvo a RPMS1 (dsiRPMS1.1 e dsiRPMS1.2), o controle positivo dsiHPRT, um controle negativo e uma condição na qual nenhum dsRNA foi transfectado. ....51

**Figura 25** - Expressão de *RPMS1* e *HPRT* em nível transcricional avaliado por qPCR na linhagem celular HEK293 (expressando *RPMS1*) após transfecção dos dsRNAs com ambos os genes como alvos. **A** – Transfecção de 200nM de dsRNA contra *RPMS1* (*RPMS1.1* e *RPMS1.2*), o controle positivo *HPRT* e um controle negativo. **B** – Transfecção de 200nM de dsRNA contra *RPMS1* (*RPMS1.1* e *RPMS1.2*), o controle positivo *HPRT* e um controle negativo. O experimento foi realizado apenas uma vez. ....52

**Figura 26** - Expressão de EBV *RPMS1* e *HPRT* em nível transcricional avaliado por qPCR na linhagem IBL1 transfectados com os dsRNAs. **A** - Células IBL1 transfectadas com o reagente Mission e dsRNA contra *RPMS1* (*RPMS1.1*), o controle positivo *HPRT* e o controle negativo. **B** - Células IBL1 transfectadas com o reagente DhamaFECT 1 e dsRNA contra *RPMS1* (*RPMS1.1*), o controle positivo *HPRT* e o controle negativo. **C** - Células IBL1 transfectadas por eletroporação utilizando o Neon e dsRNA contra *RPMS1* (*RPMS1.1*), o controle positivo *HPRT* e o controle negativo. Os experimentos foram realizados apenas uma vez. ....53

**Quadro 1** - Autenticação das linhagens celulares utilizadas. Todas as linhagens foram analisadas comparando os perfis de STR obtidos com os apresentados em biorepositórios ou publicados na literatura. ....25

**Quadro 2**- Linhagens celulares para genotipagem do SNP A155391G, incluindo linhagens previamente genotipadas, e expressão do RNAm do gene da *RPMS1*. ....26

**Quadro 3** - Iniciadores, componentes de reação e condições de termociclagem dos experimentos de PCR para preparação e análise de vetores recombinantes para expressão de *RPMS1* do EBV .....28

**Quadro 4** - Discriminação das condições experimentais para preparação ou validação dos vetores pENTR/SD/D-TOPO-EBV\_*RPMS1* e pLenti6.3/TO/ EBV\_*RPMS1*. ....29

**Quadro 5** - Discriminação das condições experimentais de sequenciamento Sanger para validação dos vetores pENTR/SD/D-TOPO-EBV\_*RPMS1* e pLenti6.3/TO/EBV\_*RPMS1*. ...30

**Quadro 6** - Iniciadores, componentes da reação e as condições de termociclagem dos experimentos de PCR para genotipagem e expressão da *RPMS1*. ....34

## 1. Resumo

O vírus Epstein-Barr (EBV) - formalmente gammaherpesvirus humano 4 (HHV-4) - é um herpesvírus associado ao desenvolvimento de uma variedade de malignidades humanas. Entre elas, destacam-se o linfoma de Burkitt (BL) e o carcinoma nasofaríngeo (NPC), além de subconjuntos de casos de linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin (particularmente em pacientes imunocomprometidos) e carcinomas gástricos. A RPMS1 é um produto viral do EBV gerado por processamento alternativo (splicing) do segmento transcrito BamHI A direito (BART) e pouco estudado. Sabe-se que essa proteína viral está implicada na modulação da via Notch e possivelmente contribui para a transformação celular induzida pelo EBV. Digno de nota, um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) A/G na posição 155391 na ORF de RPMS1 foi associado com maior risco de NPC. Assim, esse trabalho teve como hipótese de que a expressão de RPMS1 do EBV poderia influenciar o fenótipo de linhagens de células humanas imortalizadas e neoplásicas in vitro. Para isso, foi feita a montagem de um vetor lentiviral contendo a ORF da RPMS1 que seria empregado para futuros experimentos. Por problemas na transdução, um vetor com expressão constitucional de RPMS1 foi empregado para avaliar as células NP69 quanto a migração e viabilidade celular. Foi observado que as células que expressavam mais taxa de RNAm de RPMS1 apresentavam menor viabilidade celular. Quanto a migração, nenhuma alteração foi notada. Adicionalmente, células linfoides EBV positivas foram genotipadas quanto ao SNP 155391 e toda apresentaram a variante G. Por fim, o nível de expressão de RPMS1 pelas células linfoides foram analisados, mostrando que cada linhagem expressa esse gene em quantidades diferentes.

---

## 2. Abstract

The Epstein-Barr virus (EBV) – formally human gammaherpesvirus 4 (HHV-4) – is a herpes virus associated with the development of a variety of human malignancies, notably Burkitt lymphoma (BL) and nasopharyngeal carcinoma (NPC), but also subsets of cases for Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas (particularly in immunocompromised patients) and gastric carcinomas. RPMS1 is an EBV viral product generated by splicing of the BamHI A transcribed segment (BART) and with only a few studies published about. It is known that this viral protein is involved in the modulation of the Notch pathway and contributes to EBV-induced cell transformation. Of note, a single nucleotide polymorphism (SNP) A / G at position 155391 in the ORF of RPMS1 was associated with an increased risk of NPC. Thus, this work hypothesized that the expression of EBV RPMS1 could influence the phenotype of immortalized and neoplastic human cell lines *in vitro*. For this, a lentiviral vector containing the ORF of RPMS1 was assembled for future experiments. Due to transduction problems, a vector with constitutional expression of RPMS1 was used to evaluate NP69 cells for cell migration and viability. It was observed that cells that expressed a higher rate of RPMS1 mRNA had lower cell viability. As for the migration, no changes were noticed. In addition, positive EBV lymphoid cells were genotyped for SNP 155391 and all presented the G variant. Finally, the level of RPMS1 expression by lymphoid cells was analyzed, showing that each cell line expresses this gene in different rates.

---

---

### 3. Introdução

#### 3.1 Infecção e Câncer

Cânceres são doenças de grande relevância em saúde pública mundialmente em virtude das elevadas morbidade e mortalidade associadas a essas doenças. Dados de 2018 do Programa GLOBOCAN da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicaram a ocorrência de cerca de 18,1 milhões de novos casos de cânceres em todo o mundo, sendo que quase metade dos novos casos ocorreram no continente asiático (48,4%), seguido do Europa com 23,4%, as Américas com 21% e a África 5,8%. Aproximadamente 9,6 milhões de pessoas morreram em decorrência dessas doenças naquela ano, notadamente na Ásia (57,3%) e África (7,3%)<sup>[1]</sup>.

Em termos gerais, os cânceres são caracterizados por aumento na população celular de um dado tecido, acompanhado de comprometimento do genoma dessas células em decorrência de alterações de natureza genética ou epigenética. Células neoplásicas dos cânceres são consideradas malignas por seu carácter invasivo e potencial para disseminação à distância, além de propriedades associadas a um certo grau de autonomia em relação aos mecanismos de regulação da homeostasia tecidual. Em termos biológicos, admite-se que algumas propriedades são tipicamente partilhadas entre cânceres, tais como a instabilidade genética, metabolismo energético alterado, autossuficiência em estímulos de crescimento e evasão dos estímulos supressores de proliferação, resistência a apoptose, replicação celular ilimitada, indução de angiogênese, indução de inflamação, imunoevasão, capacidade de invasão e de disseminação (e.g., por metástase)<sup>[2]</sup>.

Cânceres podem ser ocasionados por fatores hereditários, os quais podem propiciar expressão inadequada de genes relevantes para manutenção da homeostasia tecidual, exposições cancerígenas relacionadas a agressões físicas, químicas ou por agentes biológicos, além de estilos/hábitos de vida (e.g., tabagismo). Cânceres associados a infecção por microrganismos representam uma parcela significativa dos cânceres: em 2018, foi estimado que 13% dos 18,1 milhões de casos de cânceres reportados em todo o mundo eram relacionados a infecções. Sendo que a maioria ocorre em países de baixa distribuição de renda per capita (menor que 995 dólares)<sup>[3]</sup>.

As infecções por vírus merecem especial atenção dentre as causas de câncer em humanos relacionadas a agentes biológicos. Segundo os critérios da Agência Internacional de Pesquisa Contra o Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*), até o momento são reconhecidamente cancerígenas para humanos (Grupo 1) as infecções pelo vírus linfotrópico de células T humanas (*Human T-lymphotropic vírus - HTLV*), pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana (*Human Immunodeficiency Virus - HIV*), pelos vírus da hepatite B e C, pelo

---

---

vírus do papiloma humano (*Human papillomaviruses* - HPV), pelo herpesvírus do sarcoma de Kaposi (*Kaposi sarcoma-associated herpesvirus* - KSHV) e pelo vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus* – EBV) <sup>[4]</sup>. Dentre esses agentes, o EBV se destaca dentre esses agentes por estar associado a um número significativo e diferentes cânceres humanos relacionados a infecção viral <sup>[5,6]</sup>.

## 3.2 Vírus de Epstein-Barr

### 3.2.1 Generalidades

Em 1961, o pesquisador britânico Michael Epstein se familiarizou com os relatos do cirurgião britânico Denis Burkitt sobre um tipo agressivo de câncer que acometia crianças africanas, posteriormente denominado linfoma de Burkitt (*Burkitt lymphoma* - BL). Em 1964 foram publicados resultados obtidos da análise de células do BL por microscopia eletrônica, demonstrando a presença de partículas estruturalmente equivalentes às de herpesvírus, observação confirmada com o auxílio dos virologistas Werner Henle e Gertrude Henle<sup>[7]</sup>.

Formalmente denominado Gamaherpesvírus Humano tipo 4 (*Human gammaherpesvirus* 4 - HHV-4), o EBV é um herpesvírus gama do gênero *Lymphocryptovirus*. É agente etiológico da mononucleose infecciosa, além de contribuir na patogênese de diversos cânceres humanos, notadamente o BL e o carcinoma de nasofaringe (*Nasopharyngeal carcinoma* – NPC), além de parcela dos casos de linfoma de Hodgkin, carcinomas de estômago e linfomas não-Hodgkin, particularmente em pacientes imunocomprometidos <sup>[8]</sup>.

A relação etiológica do EBV com o desenvolvimento do NPC também está bem estabelecida. Em todo o mundo, pacientes com NPC associados à infecção pelo EBV contabilizam anualmente 80 mil novos casos. Embora o NPC seja um câncer raro em termos globais (cerca de 0,7% do total de cânceres humanos; incidência de 1 por 100 mil pessoas), a doença é endêmica em algumas regiões do mundo, notadamente Ásia e norte da África <sup>[9,10]</sup>.

Dentre os sintomas mais comuns associados aos carcinomas de nasofaringe estão a obstrução nasal, cefaleia, dor ou dormência facial e dificuldade para abrir a boca. A presença de massa palpável em cadeia linfática do pescoço é frequente e decorre de disseminação de células neoplásicas para os nódulos linfáticos regionais. Estudos baseados em genotipagem de genes codificadores de moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC) humano apontam que os portadores de certos alelos de MHC-I possuem maior risco de desenvolvimento do NPC. Em relação a mutações somáticas é visto que a perda alélica nos loci 3p21.3 e 9p21.3 implica em um prejuízo na expressão do gene supressor tumoral *RASSF1A*. A baixa expressão desse gene pode favorecer a expansão clonal de células infectadas pelo EBV. Adicionalmente, fatores como a dieta e hábitos culturais (por

---

exemplo, a ingestão de peixes salgados à moda chinesa, e o uso de algumas ervas para fins de medicina tradicional), influenciam no aumento do risco de NPC. <sup>[11]</sup>

Por sua vez, a forma endêmica do BL ocorre principalmente em regiões da África Central e Nova Guiné, atingindo 6.700 novos casos anualmente, aproximadamente 6 a 7 casos por 100.000 habitantes. Virtualmente os casos de BL que ocorrem no continente africano estão associados ao EBV, cerca de 50% de todos os cânceres são pediátricos. As regiões de alta incidência de BL endêmico coincidem com aquelas com alta prevalência de malária e a coinfeção pode desempenhar um papel na etiopatogenia da doença<sup>[12]</sup>. A forma esporádica do BL geralmente afeta crianças e adultos jovens, com uma incidência de 2 a 3 casos por 1.000.000 de indivíduos. Em contraste com a forma endêmica da doença, apenas 15 a 30% dos casos esporádicos de BL estão associados ao EBV na Europa e nos EUA, mas esse número pode chegar a 80% em algumas áreas da América Latina, como o norte do Brasil <sup>[8,13]</sup>. A associação do EBV com outros linfomas também é muito variável: por exemplo, o linfoma de Hodgkin clássico está associado ao EBV em 30% a 50% dos casos em relação ao linfoma difuso de grandes células B (*Diffuse large B-cell lymphoma - DLBCL*) é cerca de 10% <sup>[13]</sup>.

### 3.2.2 Ciclo biológico do EBV

O EBV infecta a maioria dos indivíduos precocemente na vida e se propaga rapidamente por meio da saliva, compartilhamento de alimentos, copos e utensílios <sup>[14]</sup>. Os sintomas da infecção primária se assemelham aos de uma gripe comum, de modo que tipicamente ela não enseja acompanhamento médico. O vírus tem tropismo principalmente por linfócitos B e células epiteliais, que eventualmente podem ser transformadas pelo EBV *in vivo*, culminando no desenvolvimento de linfomas e carcinomas, respectivamente.

A infecção de linfócitos B pelo EBV requer endocitose, enquanto sua entrada em células epiteliais dá-se por fusão da membrana plasmática da célula com proteínas presentes no capsídeo viral. A fusão é mediada por interação de proteínas virais com moléculas expressas na superfície celular, tais como as integrinas  $\alpha\beta 6$  e  $\alpha\beta 8$ . Três glicoproteínas são fundamentais na fusão do envelope viral, nomeadamente a glicoproteína B (gpB), a glicoproteína H (gpH) e a glicoproteína L (gpL). Nas células B há interação entre moléculas do MHC classe II (MHC-II), responsável pela apresentação de peptídeos extracelulares processados pela via endocítica, com a glicoproteína 42 (gp42) do EBV. Outra característica que aumenta a eficiência do processo, ainda que não seja fundamental, é a fixação da glicoproteína 350/220 (gp350/220) com o receptor para fragmento 2 do complemento (*Complement Receptor 2 - CR2*), também denominado CD21, que normalmente tem papel na ativação e maturação do linfócito B <sup>[15,16]</sup>.

À semelhança de outros herpesvírus, o ciclo biológico do EBV é tradicionalmente dividido em duas fases, denominadas fase lítica e fase latente<sup>[17]</sup>. Ao invadir a célula o vírus entra

---

em um estado de transição, pré-latente. Subsequentemente os genes de fase lítica são suprimidos (e.g., por modificações epigenéticas de cromatina), proporcionando o início da fase latente de infecção, que pode persistir por tempo indeterminado nas células infectadas do hospedeiro.

Durante a fase latente do ciclo viral, a expressão de produtos do EBV se limita a poucos genes e a replicação do vírus ocorre em sincronia com a replicação do DNA genômico celular. Tradicionalmente são descritos três perfis de expressão gênica na fase de latência do ciclo biológico do EBV, sendo que em todos é verificada a expressão de pequenos RNAs não-codificantes (*EBV-encoded small RNAs* - EBERs), transcritos à montante de BamHI-A (*BamHI-A rightward transcripts* - BART) e do antígeno nuclear 1 do EBV (*EBV nuclear antigen 1* – ENBA1). A expressão gênica viral restrita a esses produtos virais caracteriza a latência denominada tipo I (também conhecido como EBNA-exclusivo, ou *EBNA-only*), observada em linfócitos B de memória infectados e células do BL. Na latência tipo II (também denominado “programa padrão”) há acréscimo da expressão das proteínas latentes de membrana (*EBV latent membrane proteins* - LMPs) 1, 2A e 2B, sendo que esse perfil é tipicamente observado nas células neoplásicas infectadas do NPC. Por fim, na latência tipo III (“programa de crescimento”), todos os genes virais de latência são expressos; esse perfil é comumente observado em células B de distúrbios linfoproliferativos associados à infecção pelo EBV, principalmente em indivíduos imunocomprometidos <sup>[18]</sup>.

O ciclo lítico da infecção pelo EBV é caracterizado por expressão de mais de 80 genes virais, elevada replicação do DNA viral e produção de novas partículas infectantes. Dois genes expressos nessa fase são particularmente importantes: *BZLF1* e *BRLF1*. Ambos ativam a transcrição de genes virais, como o da subunidade catalítica da DNA polimerase (*DNA polymerase catalytic subunit* - BALF5) e da proteína ligadora de DNA fita simples (*single-stranded DNA-binding protein* - BALF2). Adicionalmente, sua expressão propicia circularização do genoma viral, o que facilita a expressão gênica associada à atividade do sítio de replicação *OriP* no genoma viral <sup>[19]</sup>.

Não se sabe ao certo quais os estímulos que proporcionam a reativação do ciclo lítico viral *in vivo*, mas a sinalização intercelular relacionada ao estado imunológico do indivíduo parece ter papel preponderante<sup>[20]</sup>. Por outro lado, a ativação *in vitro* pode ocorrer pela ação de estímulos endógenos, tais como o fator de necrose tumoral beta (*Tumor Necrosis factor beta* - TGF- $\beta$ ), inibidores de cálcio e hipóxia, ou ser induzida experimentalmente com substâncias químicas, incluindo os ésteres de forbol, como o TPA (*12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate* – TPA), que degrada o fosfatidilinositol e proporciona ativação das proteínas quinase C. Esse processo pode ainda ser catalisado utilizando buritrato de sódio <sup>[20]</sup>.

---

---

Dados acumulados na literatura têm sistematicamente elucidado o potencial cancerígeno do EBV, subsidiando sua classificação como agente cancerígeno para humanos<sup>[21]</sup>. De fato, diversos fenômenos biológicos induzidos pelo EBV na célula infectada contribuem para a transformação celular, sendo essencialmente dependentes da expressão de determinados produtos virais, como será discutido a seguir.

### 3.2.3 Oncogenicidade do EBV

A contribuição da infecção por determinados vírus no desenvolvimento de cânceres está associada a diversos mecanismos possíveis, incluindo a indução de instabilidade genética, regulação da morte e imortalização celular, dentre outros. De modo geral, o potencial oncogênico desses agentes está relacionado à ação de proteínas e outros produtos expressos pelo vírus na célula infectada <sup>[22]</sup>.

No caso do EBV, alguns produtos codificados no genoma do viral são particularmente relevantes. Os EBERs, por exemplo, são pequenos transcritos virais não-traduzidos que podem modular o sistema imunitário, além de suprimir a apoptose e estimular o crescimento e proliferação das células do NPC por meio da indução do fator de crescimento IGF1 <sup>[23]</sup>. Quanto aos EBNAs, é descrito que EBNA1 propicia geração de radicais livres, o que favorece instabilidade genética <sup>[24]</sup>. EBNA-LP, por sua vez, atua com EBNA2 para ativação de LMP1, que contribui na imortalização dos linfócitos B <sup>[25]</sup> e é a principal oncoproteína do EBV.

A LMP1 do EBV é uma proteína de membrana estruturalmente semelhante a receptores para fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor* - TNF). Sua principal ação descrita é a ativação constitutiva da via de sinalização intracelular NF- $\kappa$ B, proporcionando sobrevivência e proliferação da célula infectada. Em síntese, LMP1 recruta proteínas TRAFs, que ativam a enzima IKK, responsável por fosforilar I $\kappa$ B- $\alpha$ , que se liga às subunidades RelA/p50 de NF- $\kappa$ B. A fosforilação de I $\kappa$ B- $\alpha$  libera as moléculas que constituem o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, possibilitando seu acúmulo nuclear, ligação ao DNA e regulação de genes NF- $\kappa$ B-responsivos <sup>[26]</sup>. LMP1 também interfere na ação produtos de genes supressores tumorais importantes: por exemplo, bloqueia a ação pró-apoptótica da proteína p53 pela indução de TNFAIP3/A20, e interfere na ação de p16 (por metilação ou deleção do gene codificador), responsável por suspensão do ciclo celular na transição entre as fases G1/S. Também foi reportado que LMP1 proporciona desorganização de microtúbulos pela interferência na atividade de RASSF1A, além induzir transição epitélio-mesenquimal propiciar angiogênese. LMP1 contribui ainda na disseminação neoplásica por meio de inibição de genes supressores de metástases, por modular o remodelamento de matriz celular, e por estimular fatores que promovem crescimento e motilidade das células malignas <sup>[27]</sup>.

---

---

Percebe-se que as propriedades oncogênicas de alguns produtos do EBV têm sido sistematicamente investigadas nas últimas décadas, como é o caso de LMP1. O mesmo não ocorre com outros produtos virais, desses produtos ainda pouco investigados demanda maior atenção como é o caso da proteína RPMS1 do EBV que foi previamente descrita com um potencial tumorigênico e associada à um maior risco de NPC, descrito a seguir.

### 3.3 Proteína RPMS1 do EBV

A RPMS1 é produzida por edição (*splicing*) alternativa de transcritos codificados no segmento BART do genoma do EBV, tipicamente expressos durante a fase latente do ciclo biológico viral [28,29]. Altos níveis transcricionais da RPMS1 foram relatados em cenários distintos de infecção pelo EBV, incluindo NPC e amostras de adenocarcinomas gástricos (GC)<sup>[30]</sup>, além de alguns linfomas de células B<sup>[31]</sup>.

Um estudo publicado em 2005 relatou expressão do RNA mensageiro (mRNA) de RPMS1 em 45/54 (83,3%) biopsias de NPC e apenas 1/25 (4%) amostras de tecido não-neoplásico de nasofaringe. Células HEK293 transfectadas com a sequência codificadora de RPMS1 apresentaram menor tempo de duplicação em relação às células não-transfectadas (31,2h vs 40,5h, respectivamente) e um maior número de clones gerados em experimento de crescimento independente de ancoragem. Ao serem inoculadas em camundongos *nude*, células transfectadas também ocasionaram tumores mais frequentemente em comparação às células expressando apenas o vetor-base (6/6 animais vs 1/6 animais, respectivamente). Com base nesses dados, admite-se que RPMS1 pode fomentar tanto a transformação celular *in vitro* como também tumorigênese *in vivo*.<sup>[32]</sup>

O gene viral que codifica RPMS1 apresenta um SNP na posição 155391 (éxon 2), caracterizado pela transição G/A. Em trabalho publicado em 2016, Feng e colaboradores analisaram amostras originadas de diferentes regiões da Ásia obtidas da lavados de garganta de pacientes com NPC (n=60) e indivíduos sem a doença pareados<sup>[33]</sup>. A genotipagem de SNPs por PCR revelou que o SNP 155391A foi 48,4% superior em amostras de pacientes do sul da China em comparação às amostras do Norte da China e da Europa, ambas áreas com menor incidência de NPC. Entretanto, não foram detectados níveis endógenos de RPMS1 nos casos avaliados, bem como não foram notadas alterações na expressão de miRs BARTs do EBV quando comparadas RPMS1 com ambos os SNPs 155391A (referido como “mutante”) e 155391G (“selvagem”). Por outro lado, a presença do SNP 155391A ocasionou aumento da meia-vida *in vitro* da proteína em relação à presença do 155391G<sup>[33]</sup>. O mesmo grupo investigou o potencial efeito do SNP RPMS1 G155391A (além de outros 7 SNPs selecionados no genoma humano) em relação à sua associação com o risco de desenvolver NPC, reportando que a variante EBV RPMS1 155391A ocorreu na maioria (85%) dos casos de NPC. Esses dados reforçam a hipótese de que

---

---

pacientes infectados por isolados de EBV com essa variação podem apresentar maior risco para desenvolver o NPC<sup>[34]</sup>.

Um estudo publicado em 2018 sequenciou 420 amostras de DNA provenientes de adenocarcinomas gástrico, NPC e linfomas em busca de polimorfismos da RPMS1. Os resultados mostraram que 59 amostras de NPC possuíam a variante 155391A, mais frequentemente em casos do sul da China quando comparada com aos do Norte. Ao comparar casos de NPC com pacientes sem a doença, os autores notaram que essa variante de RPMS1A esteve mais relacionada ao surgimento da doença. Adicionalmente, os autores observaram que a variante A do SNP era mais frequente em amostras de NPC do que em linfomas EBV-positivos. Com base nesses dados, concluiu-se que a variante 155391A de RPMS1 pode ter papel relevante no desenvolvimento do NPC<sup>[35]</sup>.

Foi relatado que a RPMS1 se liga à proteína de ligação para sinal de recombinação da região kappa J da imunoglobulina (*Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin kappa J region* – RBPJ), um componente da via Notch que pode funcionar como um repressor de transcrição ou iniciar um complexo programa de ativação<sup>[37,38]</sup>. A via Notch é responsável por regular a interação celular e a expressão gênica de processos essenciais ao desenvolvimento, como proliferação celular, apoptose, diferenciação e angiogênese tecidual<sup>[36]</sup>. A RPMS1 também pode se ligar ao co-repressor interagindo com a proteína RBPJ (*Corepressor Interacting with RBPJ* – CIR), causando uma importante supressão gênica devido à interação com o CBF1, que permite a incorporação da histona deacetilase (HDAC) que subverte o complexo transcripcional e favorece a imortalização das células B induzida pelo EBV<sup>[39]</sup>.

Usando células HeLa expressando RPMS1, Zhang et al (2001) observaram que essa proteína viral interage com Sin3A, um componente do CBF1. Além disso, RPMS1 co-localizou com NotchIC, inibindo sua atividade de modo dependente de dose, reprimindo assim a via Notch. Os autores também relataram que a EBNA2 suporta a formação de um novo complexo da RPMS1 com CBF1, causando ativação transcricional mediada por RBPJ. Em resumo, sugeriram que a modulação de Notch por RPMS1 pode desempenhar um papel na imortalização de células B infectadas por EBV, e também pode ser um fator importante para células epiteliais de transformação, considerando o papel da via Notch na diferenciação celular<sup>[36]</sup>.

Pelo exposto, os dados atualmente disponíveis sinalizam que EBV RPMS1 pode apresentar algum potencial oncogênico. Para avaliar as possíveis ações da RPMS1 o presente estudo é visto a montagem de um vetor lentiviral contendo o gene da RPMS1 para a transfecção em células epiteliais. Devido a problemas na transdução do vetor pLenti6.3/TO/RPMS1 foi usado um vetor de expressão constitucional, pcDNARPMS1\_FLAG, para avaliar, *in vitro*, células NP69 expressando RPMS1 de modo transiente quanto a migração e viabilidade celular. Por

---

fim, células linfoides foram genotipadas quanto ao SNP 155391 da RPMS1 e avaliadas quanto a expressão de RNAm da RPMS1.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo geral**

O presente estudo visa avaliar a hipótese de que a expressão de RPMS1 do EBV pode influenciar o fenótipo de linhagens de células humanas imortalizadas e neoplásicas *in vitro*.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Identificar os níveis de expressão de EBV RPMS1 e discriminar as variantes 155391A e 155391G da RPMS1 em células linfoides constitutivamente infectadas pelo vírus.
  2. Produzir e validar a construção de vetores lentivirais para a expressão induzível *in vitro* de células epiteliais de nasofaringe humana.
  3. Avaliar efeitos de RPMS1 em células linfoides constitutivamente infectadas pelo EBV e células epiteliais de nasofaringe humana, em termos de viabilidade celular e migração *in vitro*.
-

## 5. Material e Métodos

A Figura 1 apresenta o desenho geral do estudo, detalhado nas seções subsequentes.

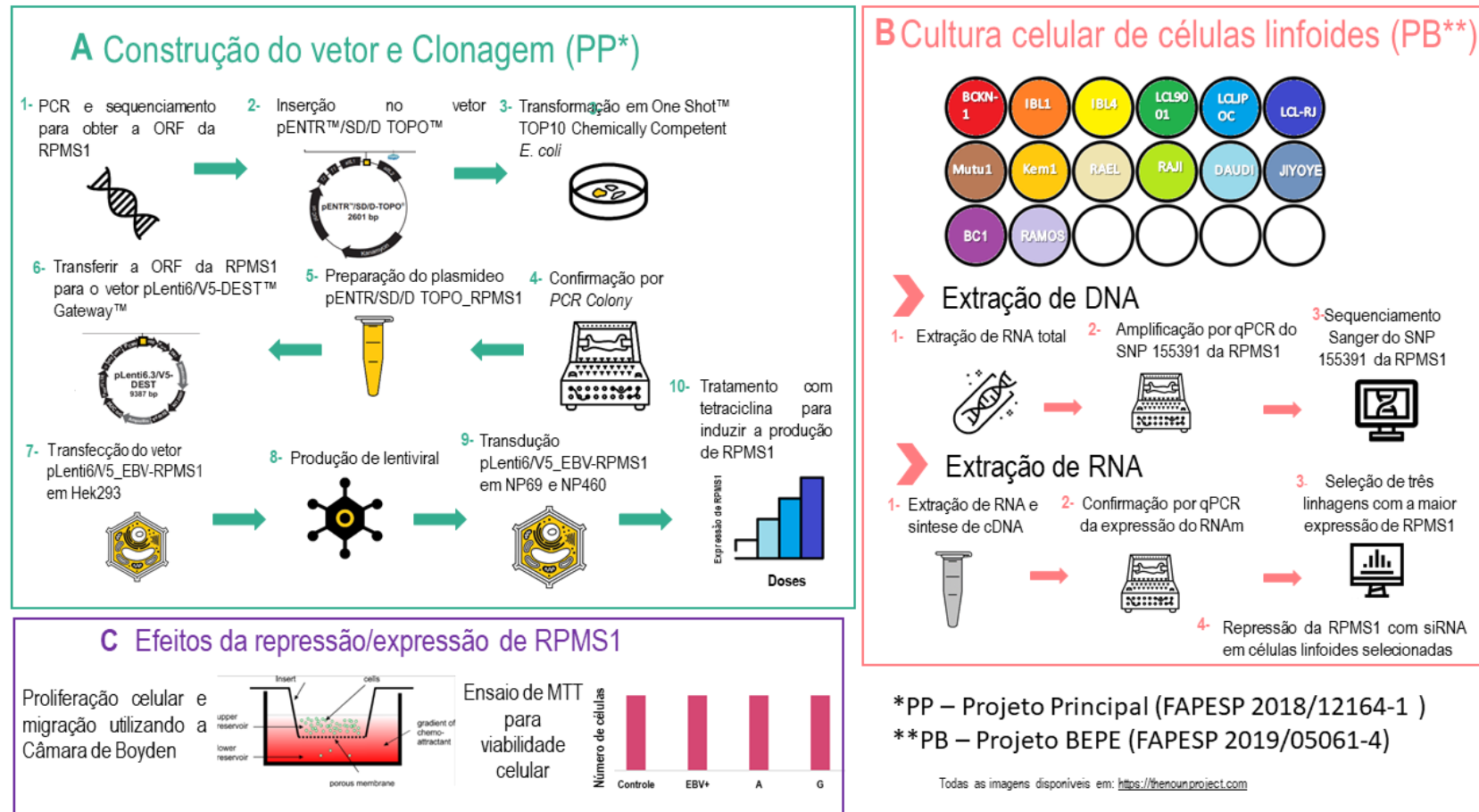


**FIGURA 1** – Delineamento geral do estudo. As etapas do projeto foram divididas em A, B e C. As etapas A e C foram realizadas no laboratório do Virican, a etapa B foi realizada majoritariamente no laboratório pertencente a Weill Cornell e partes no Virican.

## 5.1 Cultura celular

Foram usadas neste estudo as linhagens celulares HEK293, NP69<sup>SV40T</sup> (doravante denominada NP69) e NP460<sup>hTert</sup> (doravante denominada NP460). HEK293 é proveniente de células embrionárias de rim humano transformada pela ação do adenovírus humano tipo 5.<sup>[40]</sup> As linhagens NP69 e NP460 são células imortalizadas geradas a partir de células epiteliais humanas de nasofaringe pelo grupo liderado Prof. George Sai-Wah Tsao, da Universidade de Hong Kong, China <sup>[41]</sup>. NP69 foi imortalizada pela expressão do antígeno *large-T* do vírus símio 40 (*Simian Virus 40* – SV40), enquanto células NP460 foram imortalizadas pela hiperexpressão da unidade catalítica da telomerase humana (hTert). Essas linhagens celulares foram analisadas quanto a sua autenticidade por meio de análise de repetições curtas em tandem (*Short tandem Repeats* – STRs) com sistema comercial *GenePrint 10* (Promega), conforme instruções do fabricante. O perfil obtido cada linhagem está indicada no Quadro 1. genotipadas, e expressão do RNAm do gene da RPMS1.

**Quadro 1** - Autenticação das linhagens celulares utilizadas. Todas as linhagens foram analisadas comparando os perfis de STR obtidos com os apresentados em biorepositórios ou publicados na literatura.

| Linhagem | Linhagem e perfil STR obtido                                                                                                                          | Perfil Referência |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| HEK293   | AMEL: X; CSF1PO: 11, 12; D13S317: 12, 14; D16S539: 9, 13; D21S11: 28, 30.2; D5S818: 8; D7S820: 11, 12; TH01: 7, 9.3; TPOX: 11; vWA: 16, 19            | ATCC CRL-1573     |
| NP460    | AMEL: X, Y; CSF1PO: 13, 14; D13S317: 9, 10; D16S539: 11, 12; D21S11: 29, 32.2; D5S818: 11, 12; D7S820: 10, 11; TH01: 7, 9.3; TPOX: 9, 11; vWA: 17, 19 | *                 |
| NP69     | AMEL: X, Y; CSF1PO: 12, 13; D13S317: 10, 12; D16S539: 11, 12; D21S11: 30 (?), 31; D5S818: 11; D7S820: 11; TH01: 7; TPOX: 11; vWA: 16, 19              | <sup>[42]</sup>   |

(\*) Confirmado em comunicação pessoal em 04/Out/2018 com Dra. Elaine Yip, U. Hong Kong, China.

As células HEK293 foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) com acréscimo de 10% de soro fetal bovino e 0,5% de gentamicina para controle microbiológico. A cultura de células NP69 foi feita utilizando o meio para queratinócitos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, M, USA), suplementado com 5% de soro fetal bovino e 1% de gentamicina. A linhagem NP460 será mantida com meio *Defied Keratinocyte SFM* (Thermo Fisher) suplementado com fatores de crescimento fornecidos pelo fabricante, e o meio EpiLife (Thermo Fisher) na proporção 1:1, contendo 0,4% de gentamicina no meio.

Adicionalmente foram utilizadas linhagens linfoides, como mostra o quadro 2. As linhagens celulares linfoides EBV positivas estão disponíveis no laboratório chefiado pela professora

Ethel Cesarman (Universidade de Cornell, NY, EUA; coorientadora do projeto) e foram utilizadas para avaliar a expressão de RPMS1.

**Quadro 2-** Linhagens celulares para genotipagem do SNP A155391G, incluindo linhagens previamente genotipadas, e expressão do RNAm do gene da RPMS1.

| Linhagem | Descrição e Ref <sup>1</sup>                                                 | EBV <sup>2</sup> | SNP 155391 | RRID <sup>3</sup>         |
|----------|------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------|---------------------------|
| BCKN-1   | Linfoma difuso de grandes células B.                                         | Lat. II/III      | G          | <a href="#">CVCL_9637</a> |
| IBL1     | Linfoma difuso de grandes células B. HIV+ <sup>[43]</sup>                    | Lat II/III       | G          | <a href="#">CVCL_9638</a> |
| IBL4     | Linfoma difuso de grandes células B. <sup>[44]</sup>                         | Lat II/III       | G          | N.d.                      |
| LCL9001  | Células linfoblastóides de sangue periférico. <sup>[45]</sup>                | Lat. II/III      | G          | N.d.                      |
| LCLJPO6  | Células linfoblastóides de sangue periférico.                                | Lat. II/III      | G          | N.d.                      |
| Mutu1    | Linfoma de Burkitt <sup>[46]</sup>                                           | Lat.I            | N.d        | <a href="#">CVCL_7202</a> |
| Kem1     | Linfoma de Burkitt <sup>[46]</sup>                                           | Lat.I            | N.d        | <a href="#">CVCL_7199</a> |
| Rael     | Linfoma de Burkitt <sup>[47]</sup>                                           | Lat.I            | N.d        | <a href="#">CVCL_7208</a> |
| Raji     | Linfoma de Burkitt <sup>[48]</sup>                                           | Lat I            | N.d        | <a href="#">CVCL_0511</a> |
| Daudi    | Linfoma de Burkitt <sup>[48]</sup>                                           | Lat I            | N.d        | <a href="#">CVCL_0008</a> |
| Jiyoye   | Linfoma de Burkitt <sup>[49]</sup>                                           | Lat I            | N.d        | <a href="#">CVCL_1317</a> |
| BC1      | Linfoma de efusão primária (paciente HIV+; fluido ascítico). <sup>[44]</sup> | Lat I            | G          | <a href="#">CVCL_RX99</a> |
| Ramos    | Linfoma de Burkitt <sup>[50]</sup>                                           | Negativo         | -          | <a href="#">CVCL_0597</a> |

<sup>(1)</sup> Descrição original da linhagem <sup>(2)</sup> EBV: situação de infecção pelo EBV (Lat. - programas de latência I, II ou III); <sup>(3)</sup> Código de identificação de recursos de pesquisa (*Research Resource Identifiers*), rastreável na plataforma Cellosaurus (<https://web.expasy.org/cellosaurus>)<sup>[51]</sup>. N.d.: Informação indisponível.

Todas as linhagens celulares linfoides utilizadas são infectadas constitutivamente com EBV, obtidas de pacientes com diferentes linfomas, com exceção da LCL 9001 e Ramos. A linhagem LCL9001 é uma linhagem linfoide produzida a partir de linfócitos de sangue periférico espontaneamente imortalizados pela infecção por EBV<sup>[45]</sup>. A cultura celular de todas as células linfoides foi realizada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,5% do antibiótico gentamicina.

Todas as linhagens utilizadas nesse trabalho foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. O acompanhamento do cultivo celular foi realizado periodicamente com o controle da viabilidade e concentração celular, estimados por meio da técnica de exclusão do corante azul-tripán. O subcultivo das células aderentes foi realizado sempre que alcançada confluência de monocamada de 70%-80%. Nessas ocasiões, o meio de cultura exaurido era retirado e as células foram submetidas a dissociação com tripsina, lavadas e ressuspensas em Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS.) Após a contagem em hemocítômetro, as células foram ressuspensas em meio de cultura e ressemeadas em concentração adequada para menor confluência. No caso das células linfoides, foi efetuado subcultivo quando apresentaram concentração superior a 1x10<sup>6</sup> células/mL, ocasião em que recebiam acréscimo de meio de cultura em quantidade suficiente para se obter concentração de 5x10<sup>5</sup> células/mL.

---

## 5.2 Produção de vetores para expressão de EBV RPMS1

Amostras de DNA obtidas das linhagens celulares constitutivamente infectadas pelo EBV foram sequenciadas para genotipagem do SNP 155391G/A de RPMS1. Subsequentemente a linhagem IBL1 foi selecionada para experimentos subsequentes em virtude de expressar o transcrito da RPMS1 em níveis bons níveis, conforme identificado pela técnica de PCR quantitativa em tempo real acoplada a transcrição reversa (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction – RT-qPCR).

As células foram submetidas a extração de RNA total com o sistema *RNeasy Mini kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA), quantificado por espectrofotometria UV em equipamento NanoVue (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). As amostras de RNA total foram submetidas incubação com DNase I a 37°C por 20min para eliminação de DNA contaminante por meio, seguida de inativação enzimática a 67°C por 15min e armazenamento a -80°C até o uso oportuno. A produção de cDNA foi efetuada com a enzima transcriptase reversa *SuperScript® IV* (Thermo Fisher) em reações com volume final de 20 µL, compostas de 0,3µg/µl de iniciadores arbitrários, 0,5mM de dNTPs, 500ng de RNA total, tampão de reação 1x, 10mM DTT, 2U de inibidor recombinante de RNase e 200U da enzima. A reação foi executada em termociclador com incubação inicial a 65°C por 5min, seguida de 23°C - 10min, 50°C -10min, e 80°C -10min.

A amostra de cDNA contendo o SNP G previamente obtida foi submetida à reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) convencional empregando a enzima *Platinum® Taq DNA Polimerase High Fidelity* (Thermo Fisher) com iniciadores para amplificação da sequência aberta para leitura (*Open Reading Frame – ORF*) da RPMS1 e incorporação de sítios *attL1* e *attL2* para serem utilizados na clonagem *Gateway®* (Thermo Fisher). O Quadro 3 apresenta iniciadores e condições experimentais (seguindo as orientações do fabricante) para esse e outros procedimentos realizados nessa etapa do trabalho.

Para os passos subsequentes de clonagem com tecnologia *Gateway®* (Thermo Fisher), o produto de amplificação da ORF da RPMS1 por PCR foi submetido a subclonagem no vetor de entrada *pENTR™/SD/D-TOPO™* (Thermo Fisher). O sucesso de ligação do inserto ao vetor foi verificado por PCR com os iniciadores M13 (Quadro 2); as condições da reação de ligação estão indicadas no Quadro 4.

---

**Quadro 3** - Iniciadores, componentes de reação e condições de termociclagem dos experimentos de PCR para preparação e análise de vetores recombinantes para expressão de RPMS1 do EBV

| Alvos e iniciadores                                                  | Componentes da reação <sup>(1)</sup>                                                                                                                                                          | Termociclagem <sup>(2)</sup>                               |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>Amplificação da ORF de EBV RPMS1 para clonagem</b>                |                                                                                                                                                                                               |                                                            |
| RPMS1-Gt.S: CACCATGGCCGGAGCTCG-TCGAC                                 | Tampão de PCR 1x (Tris-SO4 60mM pH 8,9 / sulfato de amônio 18mM), 2,5mM MgSO4, 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA polimerase (TaqDNA Polimerase de alta fidelidade <sup>2</sup> ). | 95°C- 5min (1x);                                           |
| RPMS1-Gt.A: CCTTTGGCTGGTACAGCTGCC                                    |                                                                                                                                                                                               | 94°C-30s, 56°C - 30s, 72°C- 40s (35x); 72°C- 5min; 4°C - ∞ |
| <b>Verificação da presença de Inserto no vetor pENTR™/SD/D-TOPO™</b> |                                                                                                                                                                                               |                                                            |
| M13.S: GTAAAACGACGGCCAG                                              | Tampão de PCR 1x (Tris-HCl100mM pH 8,5/ 500mM KCl), 2,5mM MgCl, 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA Polimerase convencional <sup>1</sup>                                            | 96°C- 5min (1x);                                           |
| M13.A: CAGGAAACAGCTATGAC                                             |                                                                                                                                                                                               | 94°C-30s, 55°C - 45s, 72°C- 40s (35x); 72°C- 7min; 4°C - ∞ |
| <b>Verificação da presença de inserto no vetor pLenti6/V5-DEST™</b>  |                                                                                                                                                                                               |                                                            |
| CMV.S: CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG                                         | Tampão de PCR 1x (Tris-HCl100mM pH 8,5/ 500mM KCl), 2,5mM MgCl, 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA Polimerase convencional <sup>1</sup>                                            | 94°C- 5min (1x);                                           |
| V5C.A: ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT                                         |                                                                                                                                                                                               | 94°C-20s, 56°C - 30s, 72°C-1min (35x); 72°C- 5min; 4°C - ∞ |
| <b>Verificação da presença da ORF RPMS1</b>                          |                                                                                                                                                                                               |                                                            |
| RPMS1.S: CATGGCCGGAGCTCGTCGAC                                        | Tampão de PCR 1x (Tris-HCl100mM pH 8,5/ 500mM KCl), 2,5mM MgCl, 0,20mM dNTP, 0,30mM de cada iniciador, 1U DNA Polimerase convencional <sup>1</sup>                                            | 95°C- 5min (1x);                                           |
| RPMS1.A: GCGCCGCTTTGTCCTGGAC                                         |                                                                                                                                                                                               | 95°C-30s, 57°C - 45s, 72°C-40s (30x); 72°C- 7min; 4°C - ∞  |

(1), (2) Condições iniciais para padronização dos experimentos

**Quadro 4** - Discriminação das condições experimentais para preparação ou validação dos vetores pENTR/SD/D-TOPO-EBV\_RPMS1 e pLenti6.3/TO/EBV\_RPMS1.

| Propósito experimental                                         | Componentes da reação                                                                                                                                        | Condições da reação                                                              |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Ligação do inserto no vetor pENTR/SD/ com enzima Topoisomerase | Solução salina (1,2 M NaCl e 0,06 M MgCl <sub>2</sub> ), 15 ng de vetor pENTR/SD linearizado, 30 ng produto de PCR purificado e água ultrapura <i>q.s.p.</i> | Incubação a 22°C por 16h                                                         |
| Recombinação com LR-Clonase II                                 | Tampão Tris-EDTA (10 mM Tris-Cl , EDTA 0.51 mL 10 mM e 1 mM EDTA, pH 8,0), LR Clonase II Mix, 150 ng vetor de destino e 420 ng de vetor de entrada.          | Incubação a 22°C por 16h seguida de inativação com proteinase K a 37°C por 10min |

O construto pENTR<sup>TM</sup>/SD/D-TOPO-EBV\_RPMS1 gerado – doravante denominado pENTR-EBV\_RPMS1 – foi empregado na transformação de bactérias competentes *E. coli One Shot<sup>TM</sup> TOP10* (Thermo Fisher), conforme instruções do fabricante. As bactérias foram então cultivadas em meio nutritivo Luria-Bertani (LB) e inoculadas em meio LB-ágar acrescido de antibiótico de seleção canamicina a 50µg/mL. Constatado o crescimento bacteriano, colônias selecionadas foram submetidas à confirmação de presença do construto pENTR-EBV\_RPMS1 por meio de PCR de colônia única (*PCR-colony*) com os iniciadores de verificação da ORF da RPMS1 (Quadro 3). As colônias validadas quanto à presença do vetor foram então submetidas a crescimento seguido de purificação plasmidial empregando o sistema *QIAprep® Spin Mini-prep Kit* (Qiagen), conforme orientações do fabricante. Em seguida, foi efetuado o sequenciamento pelo método Sanger em serviço especializado do IBTEC, UNESP, empregando reagentes *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* em equipamento Applied Biosystems ABI 3500 (ambos Thermo Fisher); as condições indicadas no Quadro 5.

A reação de LR Clonase foi realizada de acordo com as condições indicadas no Quadro 4. O vetor pLenti6.3/TO/EBV\_RPMS1 gerado foi empregado na transformação de bactérias *E. coli* competentes *Max Efficiency® Stbl2<sup>TM</sup>* (Thermo Fisher), linhagem gerada especialmente para clonagem de vetores lentivirais potencialmente instáveis. Na transformação bacteriana, 2µL da reação de LR Clonase® foram adicionadas em um tubo contendo células Stbl2<sup>TM</sup>, incubadas por 30 min em gelo e tratadas em choque térmico a 42°C por 45 segundos e 2 min em gelo. As células transformadas foram então inoculadas em meio sólido LB-ágar suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 30°C por 48h. Foram selecionadas 11 colônias para confirmação do inserto pelo método de PCR de colônia com os iniciadores CMV.S e V5C.A nas condições experimentais apresentadas no Quadro 3.

**Quadro 5** - Discriminação das condições experimentais de sequenciamento Sanger para validação dos vetores pENTR/SD/D-TOPO-EBV\_RPMS1 e pLenti6.3/TO/EBV\_RPMS1.

| Propósito experimental                                                                                                 | Componentes da reação                                                                                        | Condições da reação                                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Sequenciamento do vetor pENTR/SD/D-TOPO-EBV_RPMS1</b><br>M13.S: GTAAAACGACGGCCAG<br>M13.A: CAGGAAACAGCTATGAC        | Tampão BDT 5x (Tris-HCl e MgCl <sub>2</sub> , pH 9,0), 4 µl BDT v3.1, 0,8 pmol iniciadores, 200ng plasmídeo. | 95°C – 1 min (1x);<br>96°C - 30s, 55°C - 5s,<br>60°C - 4min (35x);<br>4°C - ∞ |
| <b>Sequenciamento do vetor pLenti-6.3/TO/EBV_RPMS1</b><br>CMV.S: CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG<br>V5C.A: ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT | Tampão BDT 5x (Tris-HCl e MgCl <sub>2</sub> , pH 9,0), 4 µl BDT v3.1, 0,8 pmol iniciadores, 200ng plasmídeo. | 95°C – 1 min (1x);<br>96°C - 30s, 55°C - 5s,<br>60°C - 4min (35x);<br>4°C - ∞ |

### 5.3 Transdução lentiviral

A transdução lentiviral com os construtos pLenti6/V5-EBV\_RPMS1 foi efetuada empregando reagentes do sistema *ViraPower™ HiPerform™ T-REx™ Gateway® Expression System* (Thermo Fisher). Em síntese, partículas lentivirais foram produzidas após transfecção de células HEK293FT com coquetel de plasmídeos composto pelo construto gerado (pLenti6/V5-EBV\_RPMS1), plasmídeos requeridos para montagem dos lentivírus recombinantes (pLP1, pLP2, e pLP/VSVG) e o vetor pLenti3.3/TR, requerido para expressão induzível do transgene mediada por tetraciclina. A transfecção celular foi efetuada com carreador lipídico *Lipofectamine® 3000* (Thermo Fisher), seguindo-se orientações do fabricante do sistema experimental.

Para a produção das partículas lentivirais, as células HEK293FT foram cultivadas em meio DMEM alta glicose em estufa a 37°C com a atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h o meio foi substituído e a incubação estendeu-se nas mesmas condições por mais 72h. Ao final desse período o sobrenadante da cultura foi recolhido, centrifugado a 5000g por 5 min, filtrado em filtro estéril PVDF de 0.1 µm (Millipore, Temecula, CA, USA) e aliquotados em tubos estéreis. Os estoques lentivirais foram armazenados a -80°C até o uso.

Após obtido o sobrenadante, as células NP69 foram semeadas em placas de 6 poços (2x10<sup>6</sup> células/poço) e incubadas com os lentivírus recombinantes por 48h para infecção. Em seguida foi iniciada a seleção celular com concentrações crescentes de blasticidina para estabelecimento de linhagens celulares contendo o construto pLenti6/V5-EBV-RPMS1. Confirmado o sucesso da transdução, as células contendo a ORF de RPMS1 do EBV foram então tratadas

---

com tetraciclina para indução da expressão da proteína viral, inicialmente verificado por meio de análise de expressão de RNAm por RT-qPCR conforme previamente descrito (Quadro 3).

Os experimentos de transdução para validação do vetor lentiviral foram realizados em células NP69. As células foram plaqueadas em uma confluência de  $0,7 \times 10^6$  em uma plaque de seis poços. Após 24h do plaqueamento, foi retirado 500ul do meio já existente e adicionado 500 µl do estoque de partículas virais obtidos após 72h de transfecção. Passadas 24h da transdução foi iniciado o tratamento com blasticidina com a dose de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Comparando as células transduzidas com o controle foi visto que não estava havendo seleção com essa dose e após cinco dias aumentamos para  $2,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . A dose de seleção final foi de  $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Conforme relatado na seção seguinte, o desenvolvimento da pesquisa com o modelo de expressão de EBV RPMS1 induzível por tetraciclina não logrou êxito, posto que não foi constatada expressão da proteína viral nas células transduzidas com o construto lentiviral pLenti6/V5-EBV\_RPMS1 que foi gerado. Os experimentos necessários para estabelecer o modelo não puderam ser repetidos, face ao esgotamento do prazo para conclusão do programa de mestrado.

Assim, optou-se pela continuidade do estudo com modelo alternativo, utilizando o vetor pcDNARPMS1\_FLAG, que propicia expressão constitutiva de EBV RPMS1 em células transfectadas. Esse vetor foi gentilmente doado pelo grupo liderado pelo Prof. Paul J. Farrell, do Departamento de Virologia do *Imperial College* em Londres, Inglaterra. Além da ORF de EBV RPMS1, o construto doado pelo Prof. Farrell apresenta etiqueta FLAG fusionada à proteína, propiciando sua identificação por imunoblots empregando anticorpo anti-FLAG [28]. O modelo de expressão constitutiva de EBV RPMS1 empregando o construto pcDNARPMS1\_FLAG foi então empregado nas análises subsequentes de efeitos de RPMS1 na viabilidade celular e migração *in vitro*, conforme detalhado na próxima seção.

#### 5.4 Ensaio de viabilidade celular e migração

Os ensaios de viabilidade celular e migração foram realizados utilizando células NP69 transfectadas com as doses  $0,5 \mu\text{g}$ ,  $1,0 \mu\text{g}$  e  $1,5 \mu\text{g}$  do vetor pcDNARPMS1\_FLAG e  $1 \mu\text{g}$  do vetor-base pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen, Califórnia, EUA). A transfecção foi efetuada com o reagente carreador *Lipofectamine 3000* (Thermo Fisher), empregando protocolo do fabricante. As células foram avaliadas em regime de transfecção transiente em 24h pós-transfecção com o construto para expressão constitutiva de EBV RPMS1.

Foi realizada estimativa de viabilidade celular empregando o método colorimétrico MTT que avalia a atividade metabólica celular como um indicador indireto de viabilidade. Em linhas gerais, o ensaio é baseado na redução do sal amarelo de MTT em cristais roxos de formazan. A

---

---

mudança de cor foi avaliada por leitura espectrométrica de absorbância a 570nm em leitor de microplacas Bio-Rad modelo 680 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

O protocolo para os ensaios de MTT foi definido com base em padronizações prévias efetuadas em outros trabalhos do ViriCan. Em síntese,  $3 \times 10^4$  células foram semeadas em poços de placa de 24 poços e em triplicata biológica para cada condição avaliada. Após 24h para adesão celular, procedeu-se transfecção com diferentes concentrações de pcD-NARPMS1\_FLAG ou o vetor-base (vazio). Em 24h pós-transfecção as células foram dissociadas com tripsina e ressuspensas em 200µl de meio. Desses 200µl, 20µl eram adicionados na placa de 96 poços (aproximadamente  $5 \times 10^3$  células) mais 10µl da solução de MTT em concentração de 5mg/ml (Sigma-Aldrich), reservando-se células remanescentes para extração de RNA total. Após 4h da adição do reagente MTT, foi retirado o meio e acrescentado 200µl de DMSO às amostras. O RNA total das células transfectadas foi extraído e submetido a transcrição reversa seguindo os protocolos mencionados previamente (Seção 5.5). A expressão de EBV RPMS1 foi realizada por qPCR utilizando os parâmetros do Quadro 6, com normalização dos níveis de expressão transcricional efetuada com base no gene endógeno *HSP90*.

O ensaio de migração foi realizado utilizando protocolo baseado em Câmara de Boyden (*Transwell Assay*), para estimativa da capacidade migratória das células em relação a estímulo quimioatrator, tendo sido empregado meio acrescido com soro fetal bovino para tal. Foram utilizados insertos *ThinCert*<sup>TM</sup> (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) acoplados a poços de placa de 24 poços. Esses experimentos foram realizados com duplicatas biológicas, totalizando 8 poços compreendendo as condições experimentais definidas pelas concentrações previamente indicadas do construto pcDNARPMS1\_FLAG (0,5µg, 1,0µg e 1,5µg). Após 24h as células NP69 foram dissociadas com tripsina e resuspensas em meio Keratinocyte SFM sem a adição de soro fetal bovino e contendo 0,4% de gentamicina. Em cada inserto foram semeadas  $2 \times 10^4$  células (aproximadamente 200µl de meio) e este acoplado a poço contendo 600µl de meio completo (contendo 10% de FBS e 0,4% de gentamicina) em placa de 24 poços. Após 24h os insertos foram fixados em etanol por 20min, submetidos a secagem e então corados com cristal violeta. Procedeu-se lavagem com água para retirada do excesso do corante, nova secagem e avaliação da face externa da membrana do inserto para fotodocumentação e contabilização das células migrantes por meio de microscopia óptica convencional em microscópio invertido Primo Vert Inverted Microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). As células então foram contadas usando o programa Image J desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde (*National Institutes of Health, NIH*)(REF).

---

---

## 5.5 Genotipagem e expressão do mRNA de EBV RPMS1

Para as linhagens celulares, Mutu1, Kem1, Rael, Raji, Daudi e Jiyoye foi efetuada genotipagem baseada em PCR do SNP 1553912 de EBV RPMS1 conforme descrito a seguir.

Após extração de DNA total usando o *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, as amostras foram submetidas à amplificação de segmento da RPMS1 por PCR empregando os iniciadores e condições de reação descritas no Quadro 5. O produto de PCR foi então enviado para sequenciamento Sanger na Instalação Genômica da Universidade Cornell em Ithaca, NY, EUA, utilizando sistema *BigDye Terminator kit* (Thermo Fisher) em equipamento ABI 3730xl DNA Analyzers (Applied Biosystems, Foster City, USA). As sequências retornadas foram analisadas com auxílio do software Genious R9 (Biomatters Inc., Auckland, NZ).

Concomitantemente as células foram submetidas à extração de RNA total usando o sistema *RNeasy Plus Mini* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com DNase I, proveniente do kit RNase-Free DNase Set (Qiagen), a temperatura ambiente por 15 min, durante a extração de RNA. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria UV em um equipamento NanoVue (GE Healthcare). A produção de cDNA foi feita utilizando a enzima *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher) em uma reação final de 20ul seguindo as recomendações do fabricante. Subsequentemente foi realizado a RT-PCR para a genotipagem e expressão do RNAm da RPMS1 utilizando os primers do Quadro 6.

---

**Quadro 6** - Iniciadores, componentes da reação e as condições de termociclagem dos experimentos de PCR para genotipagem e expressão da RPMS1.

| Primers                                                                                            | Condições da Reação <sup>(1)</sup>                                                                                                    | Termociclagem <sup>(2)</sup>                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Genotipagem EBV RPMS1</b><br>S: AGAAGGCGTAGAGCATGTCCAG<br>AS: GAGTACGACTGTGAGG-TGGGCG           | PCR Buffer 1x (Tris-HCl100mM pH 8,5/ 500mM KCl), 2,5mM MgCl <sub>2</sub> , 0,20mM dNTP, 0,30mM primer, 1U conventional DNA Polymerase | 96°C- 5min (1x);<br>94°C-30s, 55°C - 40s,<br>72°C-1min (35x);<br>72°C- 10min; 4°C - ∞ |
| <b>Expressão da EBV RPMS1 condição 1</b><br>S: CATGGCCGGAGCTCGTCGAC<br>A: GCGCCGCTTTGTCCTGGAC      | Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (2,5 mM MgCl <sub>2</sub> ), 0,30mM primer.                                                  | 95°C-10min (1x);<br>95°C - 15s, 60°C-<br>1min (40x);                                  |
| <b>Expressão da EBV RPMS1 condição 2</b><br>S: CATGGCCGGAGCTCGTCGAC<br>Gt.A: CCTTTGGCTGGTACAGCTGCC | Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (2,5 mM MgCl <sub>2</sub> ), 0,30mM primer.                                                  | 96°C- 5min (1x);<br>95°C-30s, 57°C - 20s,<br>72°C-30s (40x);                          |
| <b>Controle endógeno 18s</b><br>S: AGAAACGGCTACCACATCCA<br>A: CACCAGACTTGCCCCTCCA                  | Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (2,5 mM MgCl <sub>2</sub> ), 0,30mM primer.                                                  | 96°C- 5min (1x);<br>95°C-30s, 57°C - 20s,<br>72°C-30s (40x);                          |
| <b>Controle endógeno HSP90</b><br>S: TCTGGGTATCGGAAAGCAAGCC<br>A: GTGCACTTCTCAGGCATCTTG            | Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (2,5 mM MgCl <sub>2</sub> ), 0,30mM primer.                                                  | 96°C- 5min (1x);<br>95°C-30s, 57°C - 20s,<br>72°C-30s (40x);                          |

<sup>(1), (2)</sup> Condições iniciais utilizadas. S e AS: iniciadores sense e antisense, respectivamente

O cDNA gerado a partir do painel de linhagens linfoides foi submetido a qPCR e o nível de expressão de EBV RPMS1 foi estimado utilizando o método  $\Delta\Delta Ct$  [52]. Brevemente, o primeiro passo realizado foi o cálculo do  $\Delta Ct$ . Para isso foi necessário utilizar a média Ct (número obtido na qPCR) de genes endógenos, sendo empregados os genes codificadores da fração 18s do RNA ribossomal e da proteína HSP90 como alvos. Com a média Ct de ambos os genes, fizemos outra média (média endógena), mas agora usando a soma da média aritmética simples de expressão transcricional de 18S e HSP90. A média endógena foi subtraída do valor Ct de referência de EBV RPMS1 para células IBL1, obtendo-se o  $\Delta Ct$ . Obtido o  $\Delta Ct$  de todas as amostras, o resultado foi diminuído pelo  $\Delta Ct$  de IBL1, gerando  $\Delta\Delta Ct$ . Como referência para as análises a expressão transcricional de EBV RPMS1 convencionou-se utilizar a expressão verificada em células IBL1, definida como expressão diferencial (*fold change*) igual a 1, de modo que seu  $\Delta\Delta Ct$  é 0 (zero). Por fim, a expressão diferencial de todas as amostras, em todas as condições experimentais, é estimada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , conforme descrito na literatura [52].

As condições de detecção de RPMS1 em nível transcricional foram divididas em 1 e 2 (Quadro 6), visto que durante os experimentos foi constatado que os oligonucleotídeos iniciadores que foram selecionados para a detecção de RPMS1 (verificação da ORF no quadro 2 e a condição 1 do quadro 5) não anelavam na sequência do RNAm produzido pelas células transfectadas pelo vetor.

## 5.6 Repressão de EBV RPMS1 por RNAi

Em linhas gerais, linhagens celulares constitutivamente infectadas pelo EBV e com expressão verificada de RPMS1 foram submetidas a tratamento de RNA de interferência com dois dsRNAs específicos para o transcrito dessa proteína viral: dsiRNARPMS1\_1 (Sense: GCAGGAUAUCUGCAGGAUCAGGUC e Antisense: UGCGUCCUAUAGACGUCCUAGUC-CAGU) e dsiRNARPMS1\_2 (Sense: GAGGACGCAGGAUAUCUGCAGGATC e Antisense: GUCUCCUGCGUCCUAUAGACGUCCUAG), sintetizados pela empresa IDT (Newark, NJ, EUA). Moléculas de dsiRNA possuem alguns pares de base a mais que o siRNA convencional, o que facilita o seu reconhecimento pela enzima Dicer, que a partir do dsiRNA produz o siRNA dirigido ao alvo pretendido <sup>[53]</sup>, no caso o transcrito de EBV RPMS1 nas células em que é expresso, quer seja em contexto de infecção constitutiva pelo vírus ou nas células transfectadas para expressão ectópica desse produto viral.

Os dsiRNA foram transfectados utilizando os carreadores *Lipofectamine 3000* (Thermo Fisher), *MISSION® siRNA Transfection Reagent* (Sigma-Aldrich) e *DharmaFECT 1 Transfection Reagent* (GE Healthcare Dharmacon, Inc. Colorado, EUA). Posto que as células linfóides apresentam baixa taxa de transfecção com esses reagentes, optou-se por efetuar nucleoporação empregando o sistema proprietário *Neon Transfection System* (Thermo Fisher). Todas as transfecções foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes. A concentração de dsiRNAs utilizada para os experimentos foi 200nM, sugerida pela fabricante. Em 24h pós-transfecção (quer seja com os carreadores lipídicos ou eletroporação), a expressão de EBV RPMS1 foi estimada por qPCR utilizando as condições descritas no Quadro 6.

O primeiro experimento analisou a expressão de RPMS1 e o dsiRNA controle (dirigido ao transcrito do gene *HPRT*) em células Raji e IBL1 utilizando o carreador Lipofectamine 3000, sem sucesso. A fim de avaliar se os dsiRNAs estavam funcionando para repressão (*knocking-down*) de EBV RPMS1, as mesmas condições de inibição foram realizadas com uma célula HEK293 estavelmente transfectadas com o construto pcDNARPMS1\_FLAG e validada quanto a expressão do produto viral em nível transcricional. Uma vez verificada inibição de EBV RPMS1 com os dsiRNAs específicos na linhagem HEK293, novos experimentos de *knocking-down* de EBV RPMS1 foram efetuados com a linhagem IBL1, empregando tanto os agentes

carreadores indicados como a eletroporação. Os resultados desses experimentos são expostos no item 6.5.

## 5.7 Análise dos resultados

Ao encerramento do prazo para conclusão do programa de mestrado foram obtidos resultados empregando o construto lentiviral pLenti6/V5-DEST\_RPMS1 ou pcD-NARPMS1\_FLAG, empregados, respectivamente, na transdução ou transfecção transiente das linhagens de células imortalizadas de nasofaringe. Com base nesses modelos foram estimados os possíveis efeitos da expressão de EBV RPMS1 no fenótipo das células *in vitro*, definido com base na taxa de proliferação/viabilidade celular e migração.

Para a estatística apresentada foi definido que os dados eram não-paramétricos tendo como parâmetro o número baixo de amostras e a presença de alguns *outliers* <sup>[54]</sup>. Desse modo, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, com análise suplementar pelo teste de Dunn caso  $p < 0,05$ . Foi estabelecido nível de significância de  $\alpha = 0,05$  na análise dos resultados e todos os gráficos são apresentados com desvio padrão pela mediana.

---

## 6. Resultados

### 6.1 Preâmbulo

Na primeira fase deste estudo, conduzimos os experimentos de clonagem isolando a sequência codificadora ORF do gene viral RPMS1, produzindo um vetor de entrada pENTR/SD/RPMS1 empregando inserção direcional. Após a montagem desse construto foram realizadas as reações de recombinação para a produção do vetor destino pLenti6.3/TP/RPMS1, seguindo para a transfecção de células HEK293FT e produção de partículas virais. Não obtendo sucesso na transdução das células NP69, padronizamos a expressão de RPMS1 com o vetor pcDNARPMS1\_flag e analisamos as taxas de viabilidade celular e migração com diferentes concentrações do vetor. Adicionalmente, as linhagens linfoides foram genotipadas quanto ao SNP 15591 da RPMS1 e a expressão transcricional dessa proteína viral foi estimada RT-qPCR. A repressão da expressão de RPMS1 com os dsiRNAs também foi efetuada durante o desenvolvimento do projeto, mas sem resultados satisfatórios nas linhagens testadas até o encerramento do prazo para conclusão do programa pós-graduação, nível mestrado.

### 6.2 Geração dos construtos para transdução lentiviral de EBV RPMS1

Para construção do vetor lentiviral para expressão constitutiva de RPMS1 optamos por utilizar a ORF proveniente da linhagem EBV-positiva IBL1, que possui o SNP 155391G. A amplificação da ORF de RPMS1 foi efetuada por PCR com os iniciadores RPMS1-Gt.S e RPMS1-Gt.A, desenhados para inserção direcional no vetor de entrada pENTR/SD/D-TOPO® (Thermo Fisher), conforme condições indicadas no Quadro 6. O produto de PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose (Figura 2) e o rendimento total da reação foi de 105ng/μL de vetor.

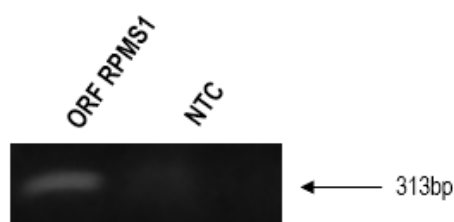


**Figura 2** - Eletroforese em gel de agarose 2% com produto de PCR da ORF de RPMS1 amplificada a partir da linhagem EBV positiva IBL1. O gel apresenta banda com tamanho predito para a ORF RPMS1 (313 bp). Amostra não contendo material amplificável é representada por NTC. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*.

Após purificação em gel, foi realizada clonagem direcional do inserto amplificado por PCR no vetor pENTR/SD/D-TOPO® utilizando enzima topo-isomerase (Thermo Fisher). A reação foi efetuada em proporção de massa com razão 1:3 inserto/vetor (30ng de inserto purificado para 90ng de vetor pENTR) e a reação feita conforme as condições indicadas no Quadro

4. Após o período mencionado a reação foi submetida a uma PCR utilizando os primers M13 para a confirmação da ligação como visto na Figura 3.

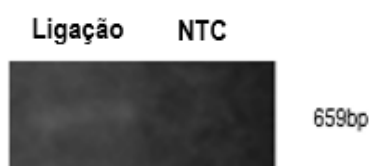


**Figura 3** - Eletroforese em gel de agarose 2% com produto de PCR da ligação de RPMS1 com o vetor pENTR/SD/D-TOPO. O gel apresenta banda com tamanho predito para a ligação (659 bp). Amostra não contendo material amplificável é representada por NTC. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*.

O construto pENTR/SD/D-TOPO-EBV\_RPMS1 gerado foi empregado na transformação de bactérias *E. coli* competentes *OneShot® TOP10* (Thermo Fisher). Em síntese, 2 µL da reação de clonagem TOPO® foram adicionadas em um tubo contendo bactérias competentes *OneShot® TOP10*, incubadas por 30 min em gelo e tratadas em choque térmico a 42°C por 45 segundos e 2 min em gelo úmido. As células transformadas foram então inoculadas em meio sólido ágar Luria-Bertani (LB) suplementado com 50 µg/mL de canamicina (para crescimento de colônias antibiótico-resistentes) e incubadas a 37°C por 18h. Após crescimento, foram selecionadas 12 colônias para confirmação do inserto pelo método de PCR de colônia (*colony PCR*) com os iniciadores M13, conforme as condições apresentadas no Quadro 3. Colônias verificadas quanto a presença do inserto (Figura 4) foram submetidas a crescimento e purificação plasmidial empregando o sistema *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen), conforme protocolo do fabricante. As colônias confirmadas também foram expandidas e armazenadas a -80°C em solução de glicerol 40%.

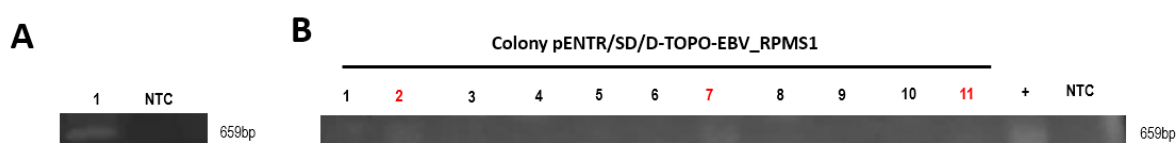


**Figura 4** - Eletroforese em gel de agarose 2% de produto da PCR de colônia para validação de transformação bacteriana com o construto pENTR/SD/D-TOPO-EBV\_RPMS1. **(A)** Resultado de eletroforese no qual uma colônia selecionada apresenta banda discreta indicando presença do construto. **(B)** As colônias 2, 7 e 11 apresentam amplificação de segmento de 659pb, consistente com o tamanho esperado para presença do inserto no vetor. Amostra não contendo material amplificável é representada por NTC. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*.

Subsequentemente foi efetuada purificação plasmidial do construto pENTR/SD/D-TOPO-EBV\_RPMS1 a partir de colônias validadas por PCR empregando o sistema *PureYield™ Plasmid Midiprep* (Promega,). Os plasmídeos purificados foram então submetidos a validação por sequenciamento utilizando o método de Sanger no equipamento ABI 3500 (Applied

Biosystems), empregando as condições experimentais indicadas no Quadro 5. Para confirmação de posição correta do inserto no vetor foram empregados os iniciadores M13.S e M13.A, que flaqueiam os sítios de clonagem e cobrem as posições C- e N-terminal do código da enzima no inserto. Consideradas as limitações técnicas do método de sequenciamento, os fragmentos sequenciados foram de aproximadamente 500 pb. Os resultados do alinhamento com a sequência de referência demonstram que o vetor montado possuía a ORF do gene da RPMS1. (Figura 5).

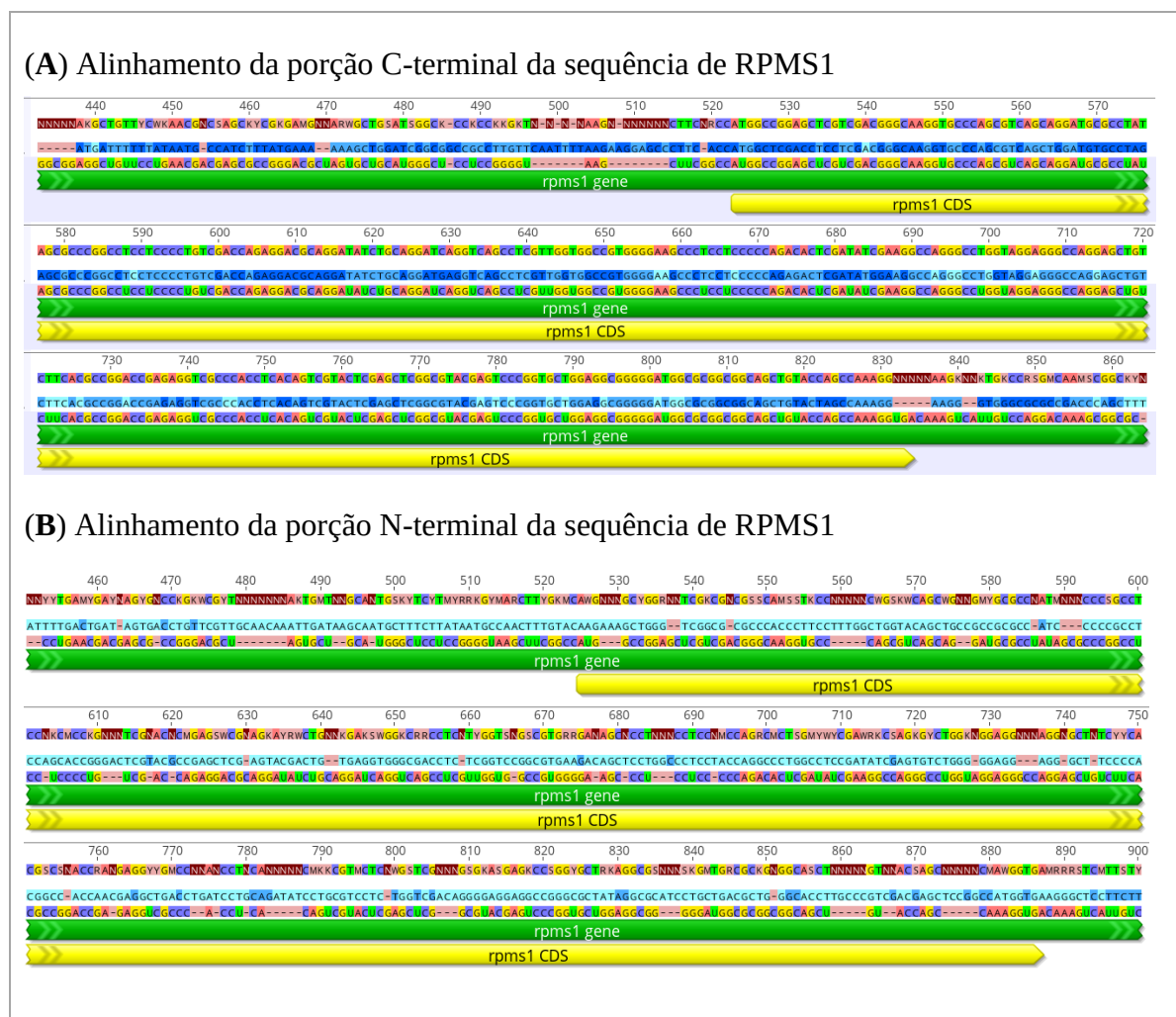


**Figura 5** - Na imagem, as sequências C-terminal (A) e N-terminal (B) da sequência de RPMS1 confirmam a posição correta do inserto no vetor pENTR/SD/D-TOPO-EBV\_RPMS1. O alinhamento das sequências obtidas por sequenciamento Sanger foi efetuado no programa Geneious v2009.2.1 (BioMatters Inc., Auckland, NZ) a partir de sequência de referência publicada na literatura <sup>[55]</sup>. CDS – região de codificação.

Os plasmídeos pENTR™/SD/RPMS1 purificados e validados foram então utilizados para transferência da ORF de RPMS1 para o vetor lentiviral de destino pLenti6.3/TO/V5-DEST empregando a enzima *LR Clonase® II Plus*, ambos constituintes do sistema *ViraPower™ HiPerform™ T-REx™ Gateway® Expression System* (Thermo Fisher). O sistema de clonagem Gateway® permite a transferência de fragmentos de DNA entre um plasmídeo de entrada e destino

utilizando um conjunto de sequências de recombinação denominada *sítios att*, são reconhecidos pela enzima LR Clonase.

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos das colônias de bactérias selecionadas após eletroforese do produto de PCR em gel de agarose 1%. Não foi observada consistência das bandas obtidas em relação ao tamanho esperado do vetor (2626 bp), mesmo após outras reações de transformação e LR clonase. Com base nesta discrepância, efetuamos análise *in silico* da sequência dos iniciadores originalmente propostos pelo fabricante com o software Geneious (Biomatters Ltd., Auckland, New Zeland). A análise de alinhamento do iniciador V5C.A revelou uma alta probabilidade de anelamento inespecífico em regiões internas do vetor, produzindo bandas de tamanhos variáveis.

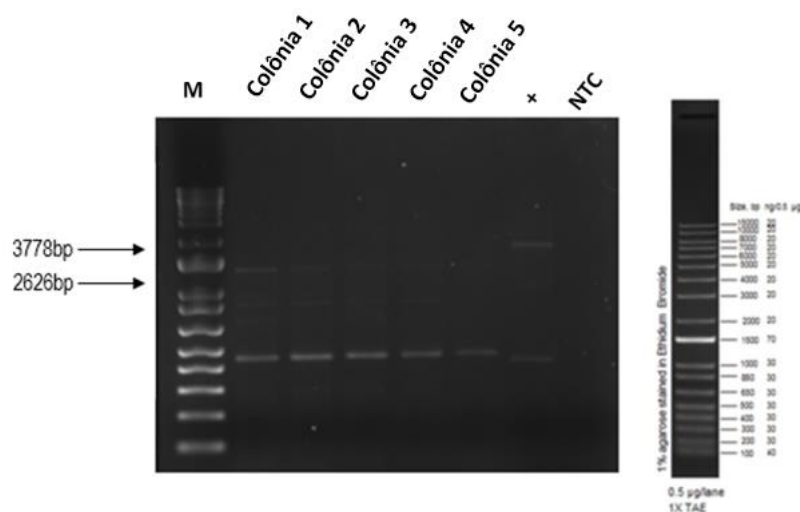


**Figura 6** - Eletroforese em gel de agarose 1% de produto de PCR colônia para validação de transformação bacteriana utilizando o construto pLenti6.3/TO/RPMS1. As colônias apresentam bandas inespecíficas e inconsistentes com tamanho esperado do inserto (2626 bp). Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*. Marcador *1kb Plus DNA* (Thermo Fisher).

A colônia 01 foi submetida a crescimento e purificação plasmidial empregando o sistema *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. A confirmação do inserto no vetor purificado foi conduzida por PCR convencional utilizando-se os iniciadores RPMS1.S e RPMS1.A, CMV.S, V5C.A e WPRE.A, com as condições experimentais indicadas no Quadro 3. Observamos bandas com os tamanhos estimado de 342 e 700bp para os pares de iniciadores RPMS1.S/RPMS1.A e CMV.S/WPRE.A, respectivamente, confirmando a presença do inserto no vetor e correta inserção no sítio de clonagem (Figura 7). As demais colônias também foram confirmadas, sendo expandidas e armazenadas a -80°C em solução de estoque glicérol 40%.

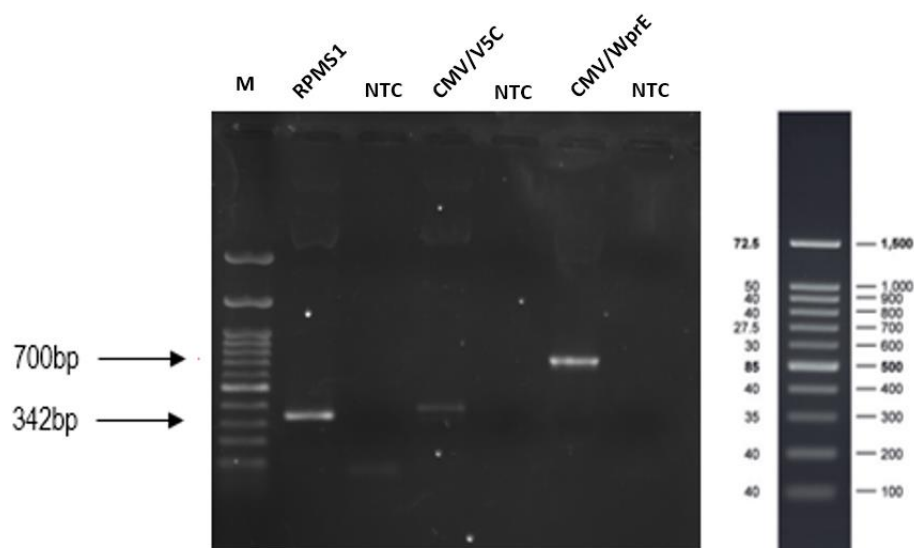


**Figura 7** - Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR do vetor purificado pLenti6.3/TOR/RPMS1 demonstra presença da *ORF* de RPMS1 confirmada pelos iniciadores RPMS1.S e RPMS1.A (342 pb). O conjunto de iniciadores CMV.S e V5C.AS apresenta anelamento inespecífico na sequência do vetor, amplificando fragmentos de tamanho variado. O conjunto de iniciadores CMV.S e WPRE.AS confirma a presença do inserto na posição e frame correto do sítio de clonagem (700 pb). Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*.

Os plasmídeos purificados pLenti6.3/TO/RPMS1 também foram submetidos a validação por sequenciamento pelo método de Sanger. Foram empregadas condições experimentais previamente indicadas (Quadro 4) e os iniciadores CMV.S e WPRE.A, que flaqueiam os sítios de clonagem. O resultado do alinhamento com a sequência de referência é apresentado na Figura 8.

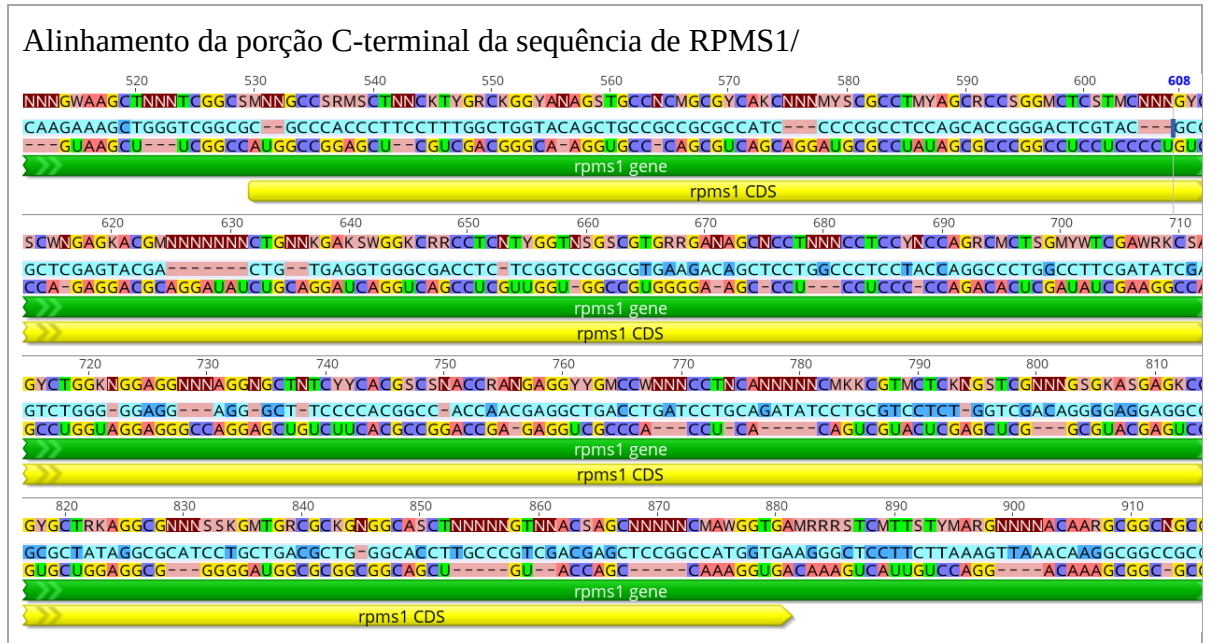


**Figura 8** – Alinhamento de sequências obtidas após sequenciamento do construto pLenti6.3/TO/RPMS1. No painel está apresentado o segmento correspondente a porção C-terminal na ORF de EBV RPMS1. Imagem gerada com software Geneious v2009.2.1 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zeland).

### 6.3 Produção e validação de partículas lentivirais em HEK293FT

Para produção das partículas lentivirais, células HEK293FT foram co-transfectadas com o construto pLenti6.3/TO/RPMS1, além dos plasmídeos pLP1, pLP2 e pLP/VSVG (requeridos para a montagem dos lentivírus recombinantes) e pLenti3.3/TR (requerido para expressão induzível do transgene mediado por tetraciclina. Os procedimentos foram efetuados com base nas instruções do fabricante do sistema. Após 72h (Figura 9), o sobrenadante foi recolhido e armazenados.

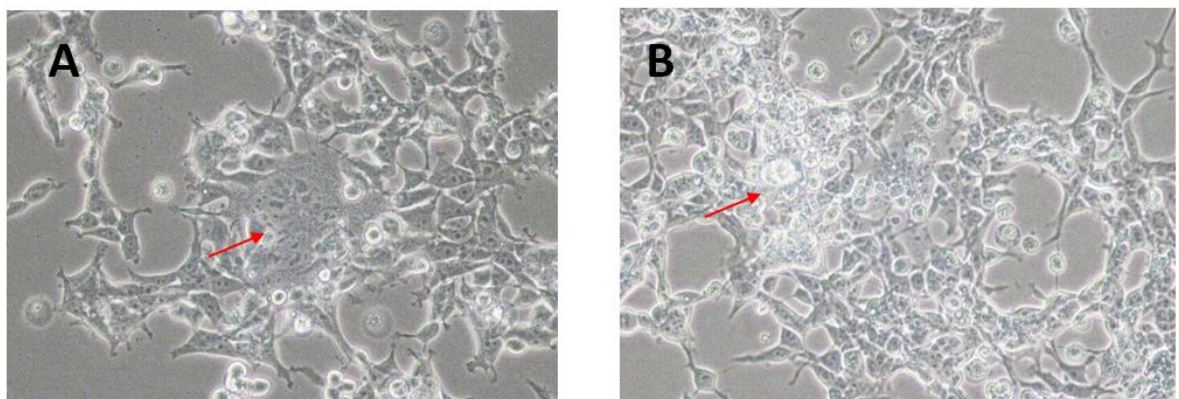


**Figura 9** - (A) Células HEK293FT 24h pós-transfecção com os vetores pLenti6.3/TO/RPMS1, pLP1, pLP2, pLP/VSVG e pLenti3.3/TR. A expressão do vetor de empacotamento pLP/VSVG proporciona fusão citoplasmática e formação de sincícios celulares, como observado na seta vermelha. (B)

72h pós-transfecção é possível observar algumas células entrando em apoptose (seta vermelha) devido a produção das partículas virais. Microscopia óptica de contraste de fase em microscópio invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). Magnificação de 200x.

Após 24h a seleção com a blasticidina das células NP69 transduzidas foi iniciada. A dose elevada para  $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$  no sétimo dia, ocasionou morte de todas as células do controle negativo (Figura 10) e a seleção de algumas colônias supostamente contendo o construto pLenti6.3/TO/RPMS1, as quais foram mantidas em cultura e expandidas por 21 dias (Figura 11).

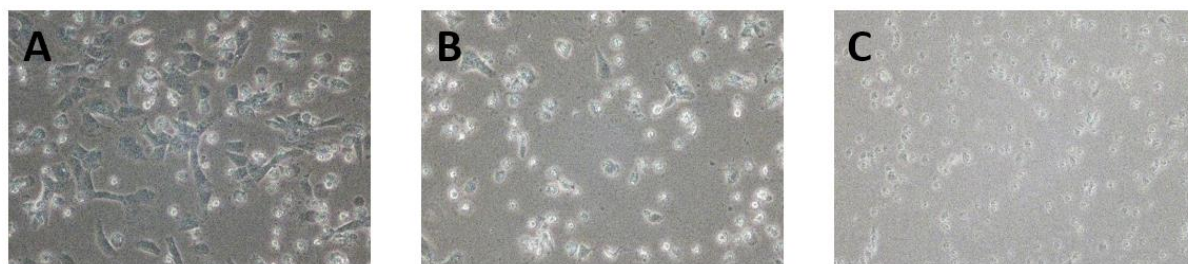


**Figura 10** - Células NP69 sem o vetor pLenti6.3/TO/RPMS1 e tratadas com doses crescentes de blasticidina, apresentando mudança de morfologia e densidade celular. **(A)** Blasticidina a  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; é notada alteração de morfologia celular **(B)** Blasticidina  $2,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; observa-se redução no número de células e aumento de *debris* celular. **(C)** Blasticidina  $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; ausência de células viáveis. Microscopia óptica de contraste de fase em microscópio invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). Aumento final de 200x.

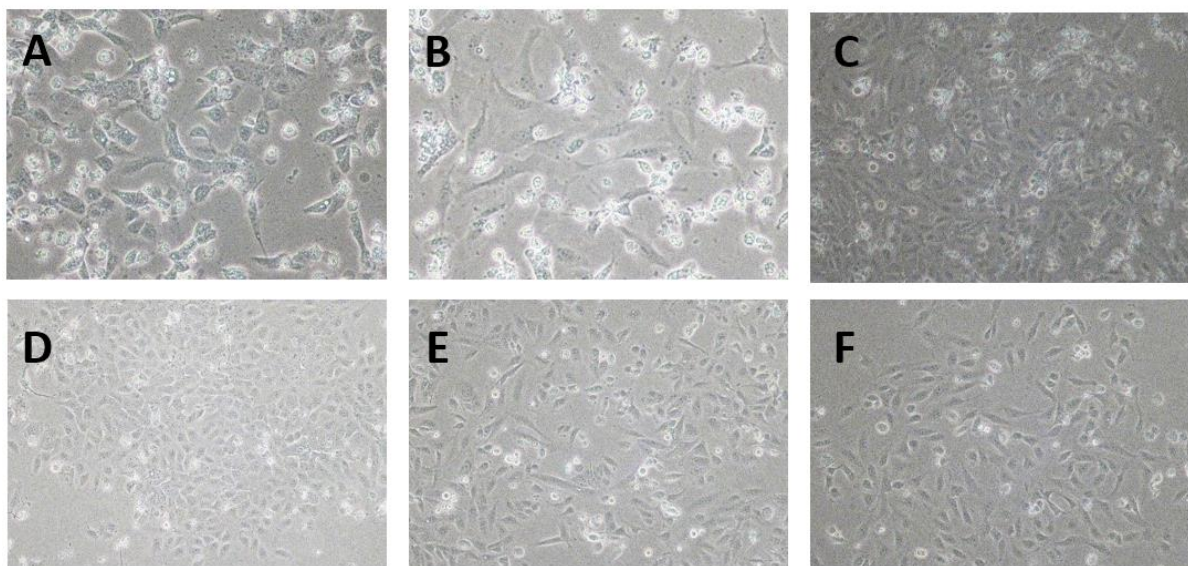


**Figura 11** - Células NP69 transduzidas com o vetor pLenti6.3/TO/RPMS1 e tratadas com doses crescentes de blasticidina, apresentando mudança de morfologia e densidade celular. **(A)** Blasticidina a  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; é notada alteração de morfologia celular **(B)** Blasticidina  $2,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$  **(C)** Blasticidina  $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; **(D)** Blasticidina  $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; dois dias após o aumento da dose. **(E)** Blasticidina  $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; seis dias após o aumento da dose, já é observado o retorno do fenótipo natural da célula. **(F)** Blasticidina  $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; vinte e um dias após o aumento da dose, é visto que as células continuaram a apresentar formato similar ao natural.

Microscopia óptica de contraste de fase em microscópio invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). Aumento final de 200x em A,B e C e 100x em D,E e F.

Após os 21 dias de seleção da transdução, foi efetuada extração de DNA para confirmar presença do construto pLenti6.3/TO/RPMS1 nas células selecionadas. A extração foi realizada utilizando o kit Wizard DNA (Qiagen) e a confirmação foi realizada por PCR nas condições descritas no Quadro 3. Os experimentos confirmaram a presença do vetor contendo o inserto da RPMS1, como mostra a Figura 12.

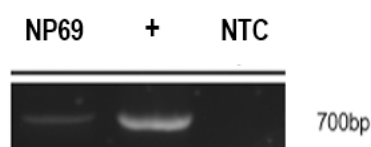


**Figura 12** - Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR da extração de DNA das células NP69 transduzidas com o vetor pLenti6.3/TOR/RPMS1, confirmada a presença do vetor pelos iniciadores CMV.S e WPRE.A (700 pb). Controle positivo é a amostra do midiPrep do vetor. Controle negativo indicado por NTC. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*.

Para a indução da expressão de EBV RPMS1 em nível transcricional foi montado uma placa de 24 poços com células NP69 transduzidas e tratadas com seis doses diferentes de tetracíclica, bem como um controle negativo. As doses foram estabelecidas a partir do protocolo do fabricante, sendo selecionadas as seguintes: 0,05µg/ul; 0,25µg/ul; 0,5µg/ µl ; 1µg/ µl ; 2µg/ µl e 10µg/ µl . Após 24h de exposição com tetraciclina foi extraído o RNA das células e a síntese de cDNA conforme previamente informado e qPCR com as condições do Quadro 3. O resultado apresentado na Figura 13 não confirma indução de expressão da EBV RPMS1 por tetraciclina nas células NP69 transduzidas.

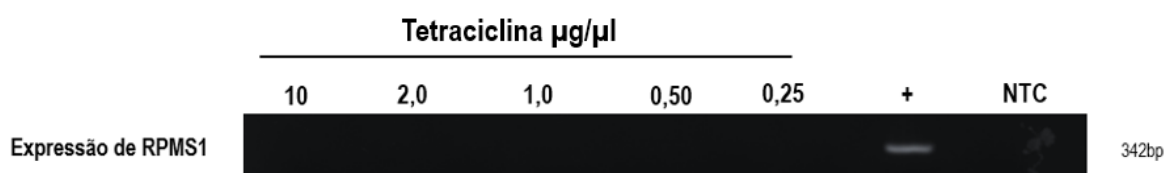


**Figura 13** - Após a transdução em células NP69 do vetor induzível pLenti6.3/TOR/RPMS1 e o tratamento com as diferentes doses de tetraciclina, foi realizada a amplificação por PCR do cDNA obtido, e o produto da reação está apresentado na eletroforese em gel de agarose 1% . Foi observado que diferentes doses e mesmo sem o tratamento, as células não apresentaram expressão da RPMS1. Controle negativo apresentado como NTC. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*

Foi levantada a hipótese de que alguma etapa da transdução poderia ter sido efetuada de forma equivocada e dessa maneira o experimento foi repetido. Três mudanças importantes ocorreram na repetição do ensaio: a primeira foi transfecção apenas do vetor pLenti6.3/TO/RPMS1, uma vez que a transfecção e a quantidade de partículas contendo cada vetor poderiam ser comprometidas quando produzidas em conjunto ao vetor pLenti3.3/TR; a segunda foi o não congelamento dos estoques virais, sendo as células alvo transduzidas logo após o período determinado; e a terceira foi iniciar a seleção por antibiótico na dose máxima de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . O resultado da seleção é observado na figura 14.

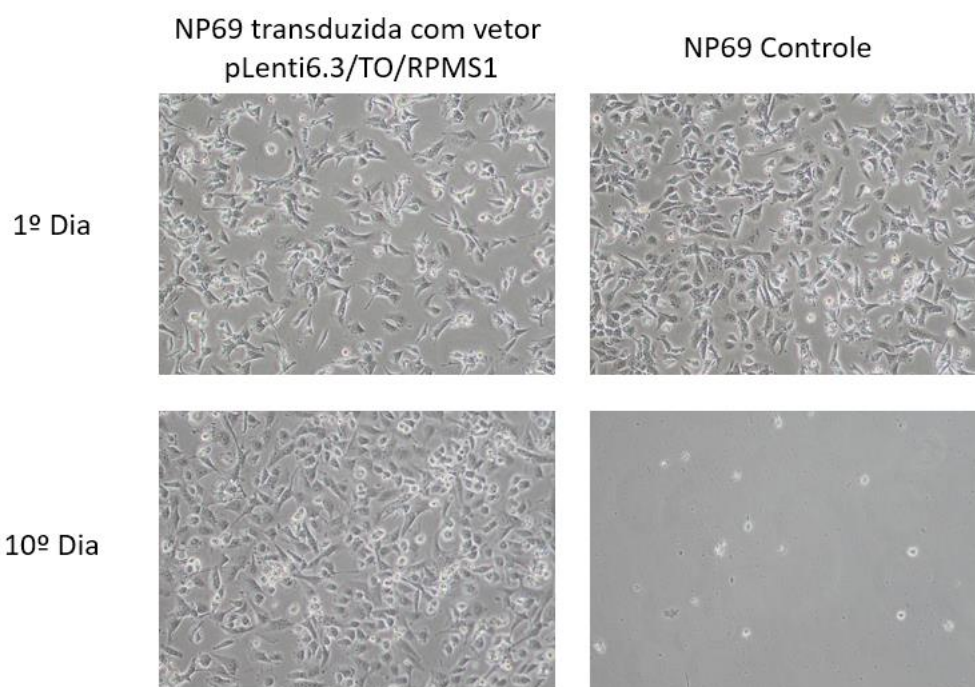


**Figura 14** – Células NP69 transduzidas com o vetor pLenti6.3/TO/RPMS1 e tratadas com blasticidina 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Painel à esquerda, células NP69 transduzidas e tratadas com blasticidina no primeiro dia e dez dias depois da exposição ao antibiótico, apresentam a mesma morfologia nos dois momentos. No painel à direita, imagens do controle no primeiro e decimo dia após seleção com blasticidina, as células não transfectadas não sobreviveram a exposição pelo antibiótico. Microscopia óptica de contraste de fase em microscópio invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments). Aumento final de 100x.

Foi separado  $1 \times 10^6$  células para extração de RNA e síntese de cDNA, previamente indicados, para detectar a expressão da RPMS1. A PCR foi realizada com as condições do Quadro 3. Assim como no experimento anterior, não foi verificada expressão de EBV RPMS1 (Figura 15).

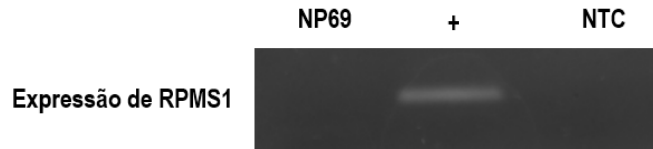


**Figura 15** - Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR da extração de RNA das células NP69 transduzidas com o vetor pLenti6.3/TOR/RPMS1, não apresentando expressão da RPMS1. Amostra de IBL1 utilizada como controle positivo. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*.

Com a repetição do resultado da primeira tentativa de transdução, a montagem e sequência do vetor foram novamente conferidas. Como o vetor não apresentava nenhuma alteração que justificasse a não expressão de EBV RPMS1, foi reavaliado o desenho dos iniciadores. Foi constatado que os iniciadores utilizados para amplificar a ORF de EBV RPMS1 na linhagem IBL1 amplificavam uma região menor que a obtida com os iniciadores de verificação (Quadro 3, Figura 16). Adicionalmente, quando a qPCR era feita com o iniciador de expressão de RPMS1 da condição 1 retirados da literatura (Quadro 6), foi percebido que o anelamento se dava em outra região do genoma viral que não englobava a ORF da RPMS1. Desse modo, os iniciadores utilizados para a expressão de RPMS1 foi a condição 2 do quadro 5.

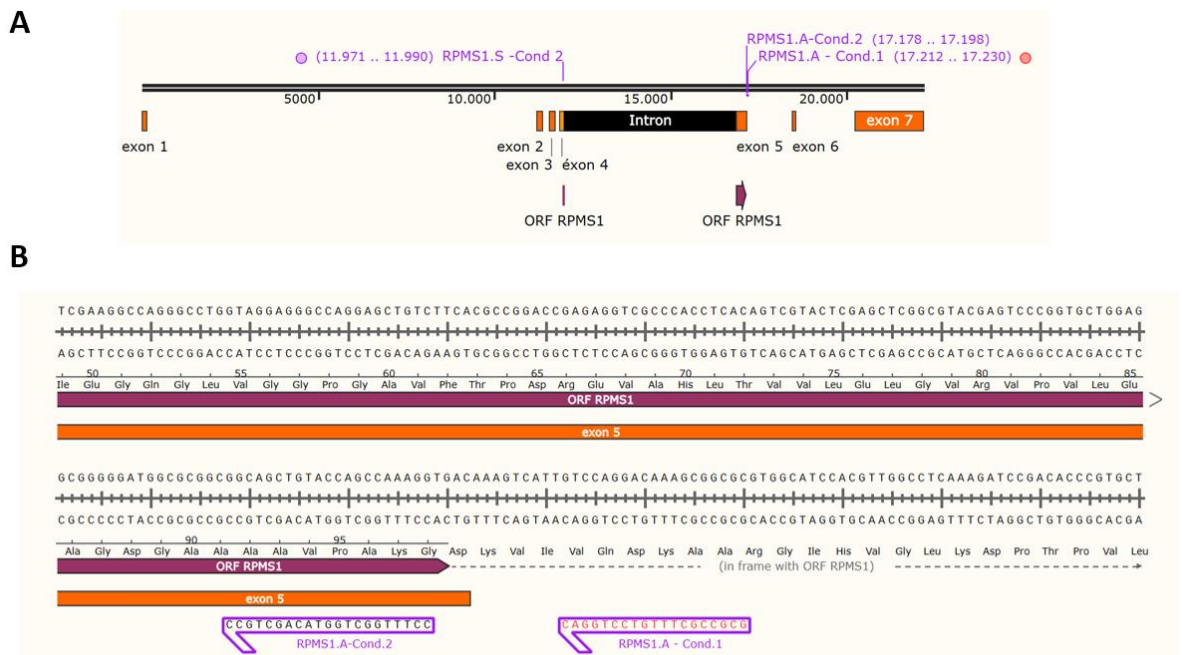


**Figura 16** – Representação do gene da RPMS1 demonstrando as anotações dos primers das condições 1 e 2. **A** – Sequência completa do gene da RPMS1 contendo as anotações dos 7 éxons e da ORF do gene. **B**- Sequência ampliada em que o iniciador da condição 1 não anela à ORF da RPMS1. Mapa criado pelo SnapGene Viewer 5.0.2 (GSL Biotech LLC, CA, EUA)

Como ainda haviam células criopreservadas do primeiro experimento de transdução, foi efetuada PCR convencional empregando novos iniciadores. Conforme demonstrado na Figura 17, as células transduzidas do experimento anterior em verdade expressavam EBV RPMS1, quando avaliados por conjunto alternativo de iniciadores dirigidos à ORF desse produto viral.

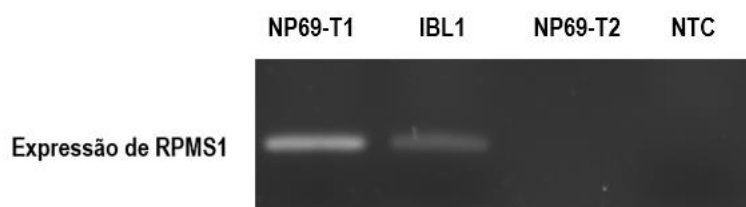


**Figura 17** - Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR da extração de RNA das células NP69 transduzidas com o vetor pLenti6.3/TOR/RPMS1 do primeiro e do segundo experimento, NP69-T1 e NP69-T2, respectivamente. Com a utilização do novo par de primers foi possível detectar expressão de RPMS1 no primeiro experimento. Amostra de IBL1 utilizada como controle positivo. Coloração com *NeoTaq Brilliant Green Plus*.

Ao resgatar células NP69 congeladas em vials criopreservados referentes ao primeiro experimento de transdução foi notada contaminação microbiana das culturas, o que inviabilizou a continuidade dos experimentos utilizando o modelo de células NP69 transduzidas. Assim, considerado o prazo para encerramento do programa de mestrado, optou-se por empregar o modelo alternativo baseado em expressão constitutiva de EBV RPMS1 a partir do construto pcDNARPMS1\_FLAG para os ensaios de viabilidade e migração celular *in vitro*, conforme previamente mencionado.

#### 6.4 Ensaios de viabilidade celular e migração

Para verificar se as diferentes concentrações do construto pcDNARPMS1\_FLAG proporcionaria níveis distintos de expressão do transcrito de EBV RPMS1, foi efetuada transfecção transiente de células NP69 com 0,5, 1,0 e 1,5µg do vetor. Subsequentemente as células foram submetidas a extração de RNA total, transcrição reversa e avaliação de expressão de EBV RPMS1 por qPCR. O resultado de três experimentos independentes é apresentado na Figura 18; nota-se aumento significativo na expressão de RPMS1 comparando-se as concentrações mais baixa (0,5µg) e mais alta (1,5µg) o vetor.

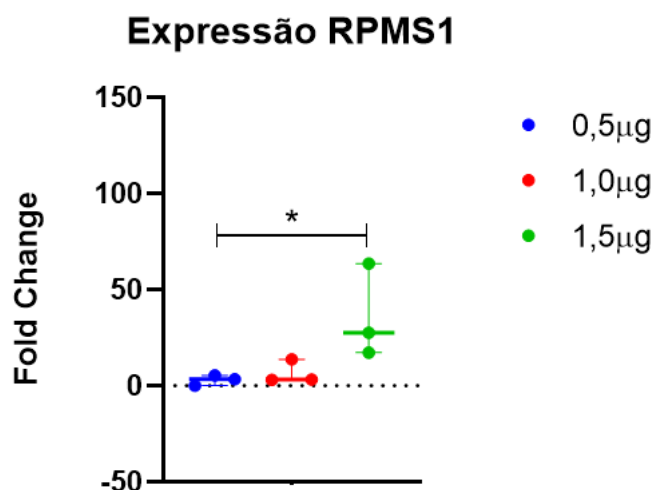


**Figura 18** - Avaliação da expressão de RPMS1 em células NP69 transfectadas com diferentes concentrações de vetor pcDNARPMS1\_flag após 24h. Os resultados das condições indicadas foram avaliados teste Dunn's demonstrando que houve diferença estatística na expressão de RPMS1 entre os grupos de 500ng e 1500ng, sendo  $p < 0,05$  (\*). Gráfico gerado com software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Subsequentemente foi estimada a viabilidade celular das células expressando EBV RPMS1 nas concentrações descritas do construto pcDNARPMS1\_flag por meio do ensaio de MTT. A Figura 19 mostra todas as concentrações do construto ocasionaram redução de viabilidade celular quando comparadas ao controle negativo (vetor-base, vazio); entretanto, não houve diferença significativa quando as concentrações foram comparadas entre si, resultado atribuído a variação em pelo menos uma das replicatas biológicas desses experimentos.

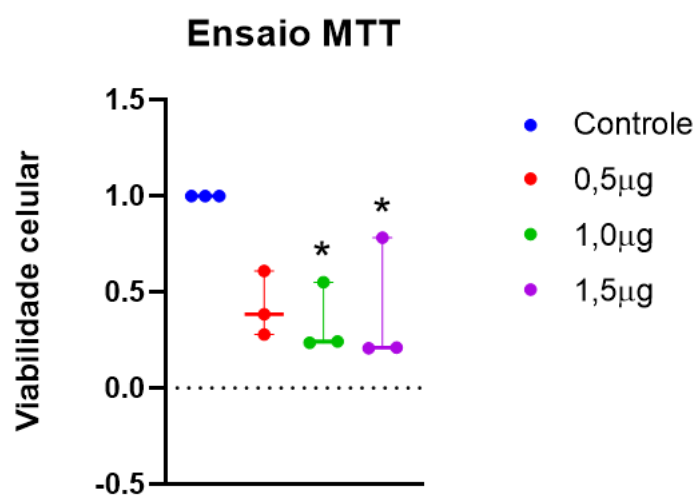


**Figura 19** - Avaliação da viabilidade celular em células NP69 transfectadas por diferentes concentrações de vetor pcDNARPMS1\_flag após 24h. O ensaio foi realizado em triplicatas e normalizado utilizando a amostra controle como referência. Os resultados das condições indicadas foram avaliados pelo teste Dunn's comparando o controle com tratados (500ng, 1000ng e 1500ng). A figura mostra que houve diminuição de viabilidade celular nos grupos tratados com 1000ng e 1500ng, sendo valor de  $p < 0,05$

(\*). Não há diferença estatística quando comparados os tratamentos entre eles. Gráfico gerado com software GrathPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Em relação aos possíveis efeitos de EBV RPMS1 em relação a migração de células NP69 *in vitro*, não houve diferença entre as condições avaliadas e dessas em relação ao controle-negativo (Figura 20). Esse resultado evidencia ausência de efeito dos diferentes níveis testados de expressão de EBV RPMS1 na migração das células NP69 *in vitro* no modelo usado de expressão constitucional em células transfectadas de modo transiente com o vetor pcD-NARPMS1\_flag.

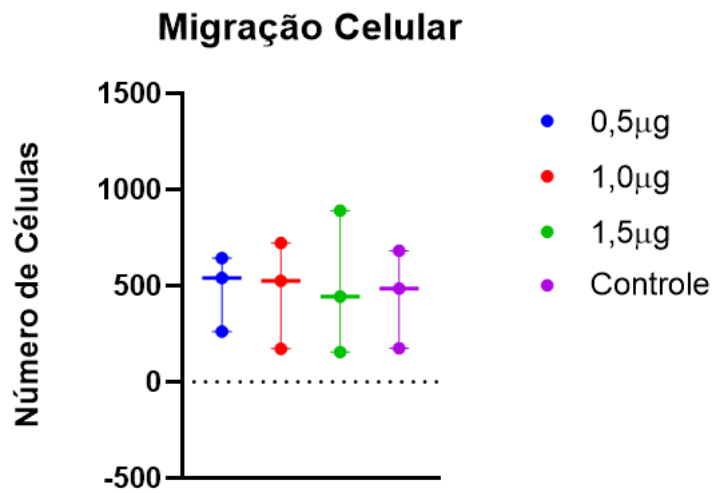


**Figura 20** - Avaliação da taxa de migração celular de células NP69 transfectadas por diferentes concentrações de vetor pcDNARPMS1\_flag após 24h. O ensaio foi realizado em triplicatas. Os resultados das condições indicadas foram avaliados teste Dunn's comparando os grupos tratados entre si. O gráfico mostra que não houve diferença estatística no número de células que migraram. Gráfico gerado com software GrathPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 6.5 Genotipagem e expressão da RPMS1 em linhagens linfoides

As linhagens apresentadas no quadro 2 foram cultivadas e recolhidas para extração de DNA seguida de PCR e eletroforese. Como mostra a figura 21, todas as linhagens apresentaram o gene da RPMS1 e para confirmar o SNP esse material seguiu para o sequenciamento Sanger (Figura 22).

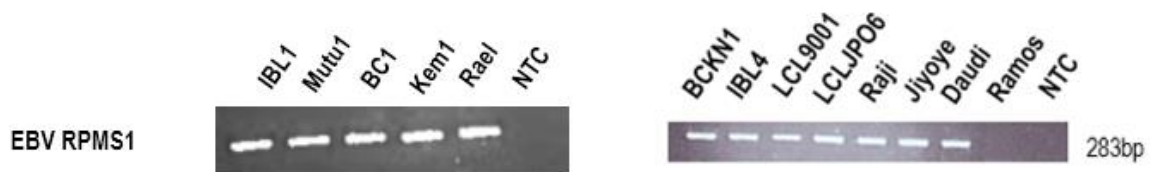


**Figura 21** - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR para amplificação de segmento da ORF para EBV RPMS1 para confirmar sua presença em contexto genômico viral em linhagens de cé-

lulas linfoides constitutivamente infectadas pelo EBV. O amplicon obtido nesse experimento foi sequenciado para genotipagem do SNP 155391 de EBV RPMS1. Coloração com *SYBER safe DNA* (Thermo Fisher).

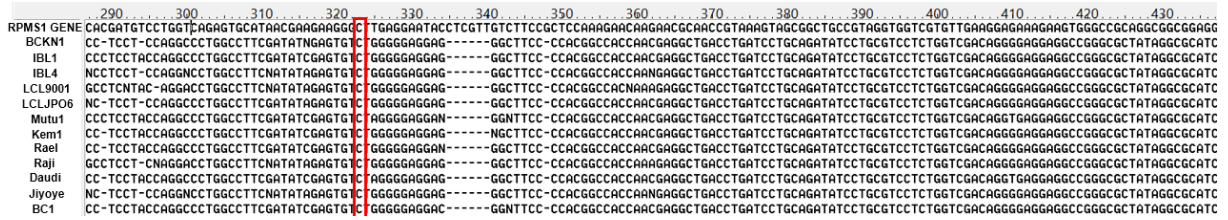


**Figura 22** – Alinhamento das sequências amplificadas de segmento da ORF de RPMS1 do EBV nas linhagens de células linfoides indicadas, constitutivamente infectadas pelo vírus. O destaque indica a região do SNP 155391 de RPMS1. A de referência está publicada na literatura <sup>[55]</sup>. Alinhamento gerado com software GeneStudio v2.2 (GeneStudio Professional Edition).

Subsequentemente, foram sintetizados cDNA das linhagens linfoides e foi realizada qPCR para a detecção de expressão do transcrito de EBV RPMS1 (condições 2 do Quadro 6). Os resultados obtidos com três experimentos independentes (triplicata biológica) estão representados no Item B da Figura 22. Com exceção de Ramos e LCL9001, todas as linhagens de células linfoides constitutivamente infectadas pelo EBV apresentaram expressão de RPMS1, com diferença significativa no nível de expressão entre as linhagens ( $p = 0,0017$ ; teste de Kruskal-Wallis). O teste de múltiplas comparações (Dunn's) mostrou que quando comparado com as linhagens que não expressam RPMS1 (LCL9001 ( $p = 0,016$ ) e Ramos ( $p = 0,016$ )), a Raji apresentou uma expressão significativamente maior do mRNA (Figura 23).

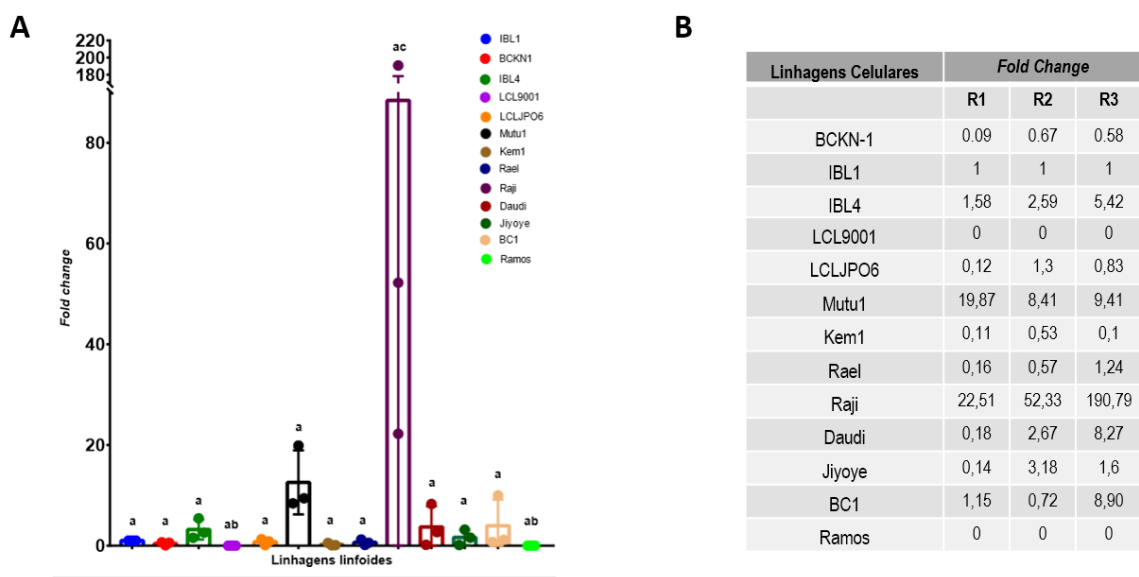


**Figura 23** - Expressão de EBV RPMS1 em nível transcricional avaliada por qPCR em células linfoides constitutivamente infectadas pelo EBV. A expressão de RPMS1 foi normalizada em relação aos transcritos dos genes que codificam a subunidade ribossomal 18S e proteína HSP90; o nível de expressão de

RPMS1 em células IBL1 foi utilizado como referência. **A-** Resultados de três experimentos independentes, apresentados com médias e desvios padrão das triplicatas biológicas de cada linhagem celular. Amostras indicadas pela letra “a” não apresentam diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ; teste de Dunn). A letra “b” indica linhagens que não apresentam diferenças entre si, mas que diferem em relação às linhagens marcadas com a letra “c” ( $p < 0,05$ ; teste de Dunn). Gráfico gerado com software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). **B-** Quadro apresentando o *Fold Change* da três replicatas utilizadas na elaboração do gráfico.

## 6.6 Avaliação da repressão de RPMS1 por dsRNA

Para avaliação inicial da repressão de RPMS1 utilizando tecnologia de RNAi, foram analisadas células Raji e IBL1 transfectadas sem dsRNAs (controle negativo), transfectadas com os dsRNAs dirigidos a EBV RPMS1 (condições-teste), ou o dsRNA dirigido ao transcrito do gene *HPRT* (controle positivo). As concentrações utilizadas foram 200nM e 100nM e o reagente carreador foi Lipofectamine 3000, conforme indicado previamente (Seção 5.6). A Figura 24 indica que não houve redução na expressão em nenhuma das duas condições avaliadas.

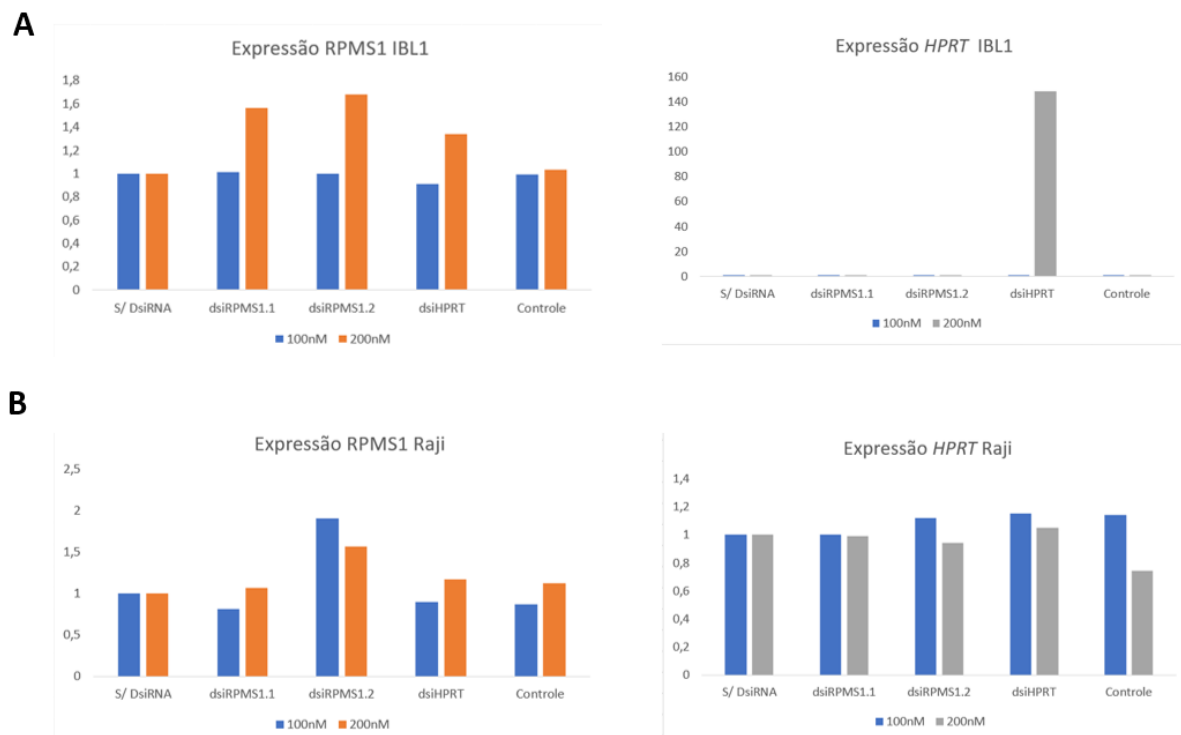


**Figura 24** – Análise da expressão de EBV RPMS1 (gráficos à esquerda) e *HPRT* (gráficos à direita) em nível transcricional por qPCR nas linhagens linfoides IBL1 e Raji após transfecção com dsRNAs específicos para os alvos indicados. **A** - células IBL1 tratadas com 200nM e 100nM de dsRNA tendo como alvo a RPMS1 (dsiRPMS1.1 e dsiRPMS1.2), o controle positivo dsiHPRT, um controle negativo e uma condição na qual nenhum dsRNA foi transfectado. **B** - Células Raji tratadas com 200nM e 100nM de

dsiRNA tendo como alvo a RPMS1 (dsiRPMS1.1 e dsiRPMS1.2), o controle positivo dsiHPRT, um controle negativo e uma condição na qual nenhum dsiRNA foi transfectado.

Um novo experimento foi realizado empregando a células HEK293 transfectada de modo estável para expressar EBV RPMS1. A utilização da HEK293 possibilitou verificar a repressão transcricional nas células transfectadas com os dsiRNAs (figura 25), contando que essa linhagem celular é mais susceptível a transfecções do que as de células linfóides.

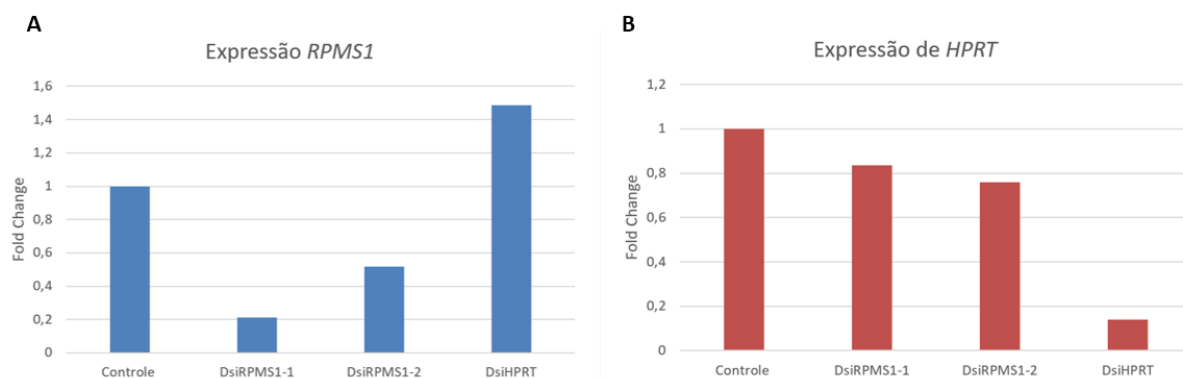


**Figura 25** - Expressão de RPMS1 e *HPRT* em nível transcricional avaliado por qPCR na linhagem celular HEK293 (expressando RPMS1) após transfecção dos dsiRNAs com ambos os genes como alvos. **A** – Transfecção de 200nM de dsiRNA contra RPMS1 (RPMS1.1 e RPMS1.2), o controle positivo HPRT e um controle negativo. **B** – Transfecção de 200nM de dsiRNA contra RPMS1 (RPMS1.1 e RPMS1.2), o controle positivo HPRT e um controle negativo. O experimento foi realizado apenas uma vez.

Confirmada a diminuição de expressão pelos dsiRNAs, sendo que o dsiRPMS1.1 apresentou uma diferença de 80% e o dsiRPMS1.2 de 50% quando comparados com o controle e o *HPRT* uma diminuição de 85%, outros carreadores lipídicos e a eletroporação foram utilizados na linhagem IBL1 na tentativa de obter repressão de expressão dos alvos, como obtido para células HEK293.

Como observado na figura 26, a utilização de outros reagentes carreadores mostrou resultados não confiáveis uma vez que as células que foram inibidas para RPMS1 apresentavam diminuição da expressão de *HPRT* e o contrário também é visto. Adicionalmente, em termos de porcentagem essa diminuição de expressão não passou dos 20%, o que não qualifica como um resultado propício para a continuidade dos experimentos. O experimento foi feito utilizando apenas o dsiRMPS.1, pois este apresentou melhor taxa de inibição quando testado na HEK293.

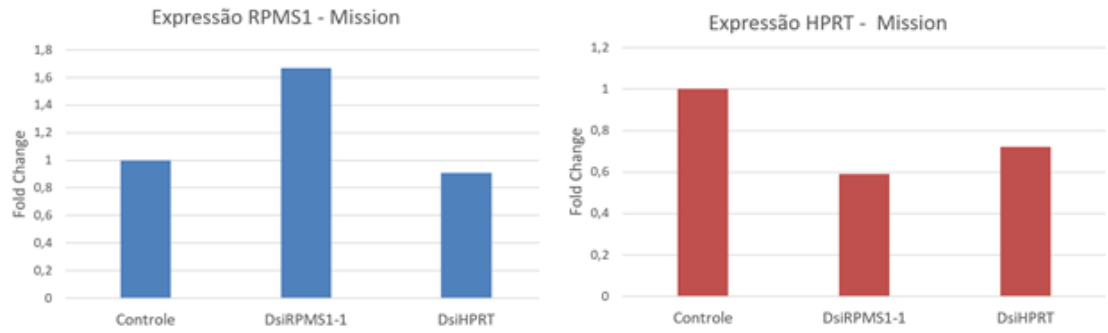
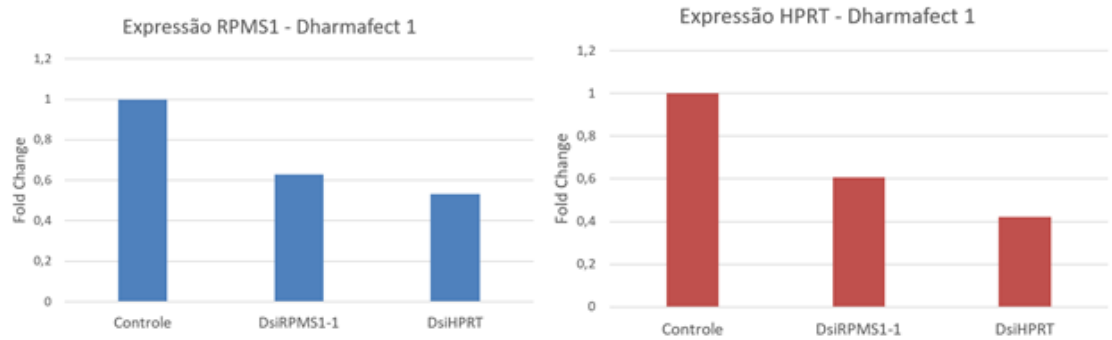
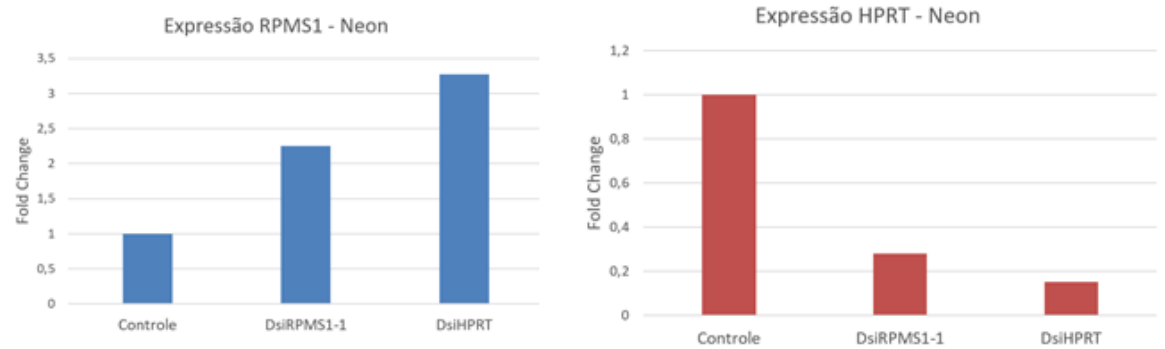
**A****B****C**

**Figura 26** - Expressão de EBV *RPMS1* e *HPRT* em nível transcricional avaliado por qPCR na linhagem IBL1 transfectados com os dsRNAs. **A** - Células IBL1 transfectadas com o reagente Mission e dsRNA contra *RPMS1* (RPMS1.1), o controle positivo *HPRT* e o controle negativo. **B** - Células IBL1 transfectadas com o reagente Dharmafect 1 e dsRNA contra *RPMS1* (RPMS1.1), o controle positivo *HPRT* e o controle negativo. **C** - Células IBL1 transfectadas por eletroporação utilizando o Neon e dsRNA contra *RPMS1* (RPMS1.1), o controle positivo *HPRT* e o controle negativo. Os experimentos foram realizados apenas uma vez.

## 7. Discussão

Trabalhos envolvendo a RPMS1 mostram que a transcrição desse gene apresenta potencial de interferir na carcinogênese são necessários maiores esclarecimentos sobre sua ação em células epiteliais e linfoides [34,35]. Os alvos celulares da RPMS1 ainda não foram suficientemente elucidados, bem como o modo de ação desse produto viral, particularmente em relação ao desenvolvimento de cânceres associados ao EBV. Dessa forma, nosso trabalho apresenta a montagem do vetor pLenti6/V5-EBV\_RPMS1 que poderá ser utilizado para avaliações futuras da RPMS1, assim como a ação do RNAm da RPMS1 na linhagem NP69 quanto as taxas de migração e viabilidade celular. Adicionalmente, nosso trabalho caracteriza a genotipagem das células linfoides quanto ao SNP 15561 e a expressão de RPMS1 nessas linhagens.

Em nosso estudo, a maioria das linhagens linfoides de células neoplásicas e não-neoplásicas constitutivamente infectadas pelo EBV expressa RPMS1 em nível transcricional, ainda que com importante variação entre as diferentes linhagens avaliadas (Figura 23). Quanto a detecção da proteína viral, um trabalho publicado em 2009 não detectou por western blot a proteína RPMS1 em linhagens linfoides EBV-positivas (Namalwa, MakI, Raji, Daudi, Jiyoye, P3HR1, C2+Obaji) e biopsias de NPC e de BL contendo o vírus<sup>[28]</sup>.

São encontrados trabalhos na literatura que demonstram a expressão de RNAm da RPMS1 em amostras constitutivamente infectadas por EBV, porém com relação a detecção de proteína ainda não há relatos de expressão em linhagens celulares e biopsias. Desse modo, alguns autores hipostenizaram que o potencial oncogênico da RPMS1 se deve ao RNA circular transcrito pelo gene.

Utilizando linhagens EBV positivas de NPC, GC e BL e iniciadores específicos para a identificação de RNAs circulares, os autores foram capazes de detectar a expressão do RNA circular da RPMS1<sup>[56]</sup>. Adicionalmente, foi construído um vetor capaz de expressar o RNA circular da RPMS1, observando que quando transfectado em células AGS ocorria aumento na taxa de migração<sup>[57]</sup>. Quando utilizamos apenas a expressão de RNAm para analisar a taxa migração (Figura 20) não foi notada nenhuma diferença no número de células que migraram, nas condições apresentadas. É importante atentar-se ao fato que os trabalhos possuem abordagens diferentes, quanto ao produto viral analisado e as linhagens. Mais estudos são necessários avaliando a ação do RNA circular em células epiteliais de nasofaringe, como a ação do RNAm em células de carcinoma gástrico.

Outro trabalho que explica a importância dos RNAs circulares foi publicado por Ungerleider *et al* em 2018, no qual os autores descrevem a predição de *in silício* 16 possíveis RNA

---

circulares RPMS1, sendo desses, dois RNAs circulares (circRPMS1\_E4\_E3a e circRPMS1\_E4\_E2) estavam presentes em linhagens celulares EBV positivo com diferentes programas de latência. Adicionalmente, com a extração de RNA de dois casos de câncer de estômago EBV positivos, foi possível detectar a presença de ambos os RNAs circulares [58]. Com a caracterização dos RNAs circulares e a detecção de ambos em amostras clínicas, o trabalho apresentou recursos para as futuras investigações sobre este transcrito viral.

A elucidação da ação de RNA circulares da RPMS1 tem recebido atenção em virtude de a região BART do genoma viral ser de fato susceptível o *backsplicing* e, consequentemente, à formação de RNAs circulares [58]. Por outro lado, é importante notar que níveis reduzidos ou indetectáveis da proteína podem ser consequência de sua rápida degradação. Assim, a investigação das propriedades biológicas de EBV RPMS1 necessariamente requer investigações acerca de efeitos atribuíveis a ambas as formas de expressão (RNA circular e proteína) desse produto viral potencialmente oncogênico.

Até o momento de redação deste trabalho não foram identificados dados de literatura sobre efeitos da expressão de EBV RPMS1 na viabilidade celular. No presente estudo, a taxa de viabilidade de células NP69 foi reduzida à medida que as células foram transfectadas com concentrações mais elevadas do construto para expressão constitutiva de EBV RPMS1 (Figura 19). Maiores esclarecimentos sobre o mecanismo de ação da RPMS1 são necessários para elucidar o motivo pelo qual obtivemos esse resultado.

Em relação aos SNPs do vírus Epstein Barr, um dos mais estudados continua sendo o SNP G155391A na ORF de RPMS1. Com o estudo dos polimorfismos, são levantadas questões como a localização de determinada cepa viral e sua implicância na distribuição geográfica de doenças associadas. Em trabalho de Feng *et al* foi visto que a versão mutante (nucleotídeo A) do SNP 155391 da RPMS1 é mais encontrada na população do Sul da China e que coincidentemente apresenta a maior taxa de NPC [33]. Um maior entendimento é necessário sobre a ação da RPMS1 em células epiteliais, principalmente no que se refere ao SNP 155391, uma vez que esse SNP pode ser um fator influenciador da incidência de câncer em algumas regiões ou proporcionar características que o tornem mais agressivo. Nosso trabalho demonstrou que em relação as células linfoides genotipadas, neste trabalho, não houve variância no SNP, sendo todas as linhagens portadoras da versão selvagem (Figura 21).

Além do SNP mencionado, sugere-se que outros SNPs na região BART do genoma do EBV podem ter papel na patogênese de cânceres associados à infecção viral. Em um trabalho publicado em 2019, os autores identificaram um SNP na posição 138557 presente em casos de NPC de diferentes regiões da China e ausente em casos de cânceres gástricos EBV positivo. A

---

---

descrição desse SNP sugere que, além do SNP 155391 de EBV RPMS1 estudado, podem haver outros com papel no risco para o desenvolvimento do NPC <sup>[60]</sup>.

Por ser uma região passível de sofrer *backsplicing* e por possuir SNPs possivelmente envolvidos com a carcinogênese, é visto que o estudo da região BART do EBV é um tema promissor. No entanto, ainda é necessário esclarecer as implicações que a expressão da RPMS1 pode gerar em células linfoides e em células epiteliais. Para isso, novos trabalhos envolvendo o estudo dos RNAs circulares, a ação dos SNPs e o possível papel da proteína são necessários para esclarecer a função da RPMS1 em células malignas.

Por fim, o presente trabalho possui algumas limitações. Pela transdução não ter sido realizada com sucesso antecipadamente, o modelo feito não é refinado quanto ao proposto. Ou seja, com a indução de expressão mediada por tetraciclina seria possível induzir mais precisamente diferentes níveis de expressão de RPMS1 e consequentemente analisar o fenótipo celular em cada uma das condições. O modelo realizado, apesar de cumprir o proposto nos objetivos, poderiam ser melhor realizados quanto ao número de amostras, uma vez que algumas condições apresentaram *outliers*.

É observado que quando comparados diferentes tipos de linhagens celulares para um mesmo experimento pode haver alterações importantes nos ensaios analisados. Desse modo, a utilização apenas da linhagem NP69 é um fator limitante ao trabalho, pois não é possível comparar os resultados com outras linhagens e esclarecer se foi um efeito local ou se é repetido em outras condições. Adicionalmente, a análise de um período de tempo (24h), dificulta a visualização do comportamento do RNAm em função do tempo, em que poderia ser observado alterações importantes.

Quanto a transfecção de células linfoides, o modelo proposto como esperado apresentou diversas dificuldades. Uma vez que as células linfoides são conhecidas pela dificuldade de serem transfectadas e apesar da utilização de diversos reagentes não se mostrou eficiente nas células testadas. A outra alternativa, eletroporação, também foi empregada sem sucesso, pois alterava a expressão do gene viral e do controle positivo (*HPRT*) não sendo um método confiável nas condições apresentadas. Observando essas limitações o projeto poderia ser repensado utilizando a proposta da produção de letivirais, uma metodologia mais comum quando há a necessidade de adicionar um material genético em células linfoides.

---

## 8. Considerações Finais

Em conclusão, o trabalho apresentou:

- A construção do vetor pLenti6/V5-EBV\_RPMS1 que poderá ser utilizado em trabalhos futuros
  - O ensaio de viabilidade celular mostrou que as células NP69 transfectadas com o vetor pcDNARPMS1\_FLAG e que expressavam mais RNAm de RPMS1 possuíam uma menor viabilidade celular.
  - Não houve efeito dos diferentes níveis testados de expressão de EBV RPMS1 na migração das células NP69 *in vitro* no modelo usado de expressão constitucional em células transfectadas de modo transiente com o vetor pcDNARPMS1\_FLAG.
  - Todas as células linfoides sequenciadas, com exceção da Ramos, possuem a variante G do SNP 15591 da RPMS1.
-

## 9. Referências Bibliográficas

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394–424, 2018. DOI:10.3322/caac.21492 | PMID: 30207593.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–74, 2011. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.013 | PMID: 21376230.
- [3] de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health* 8:e180–90, 2020. DOI:10.1016/S2214-109X(19)30488-7 | PMID: 31862245.
- [4] Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 10:321–2, 2009. | PMID: 19350698.
- [5] Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology* 392:1–10, 2009. DOI:10.1016/j.virol.2009.06.001
- [6] Elgui de Oliveira D, Müller-Coan BG, Pagano JS. Viral Carcinogenesis Beyond Malignant Transformation: EBV in the Progression of Human Cancers. *Trends Microbiol*, 2016. DOI:10.1016/j.tim.2016.03.008 | PMID: 27068530.
- [7] Epstein A. Why and How Epstein-Barr Virus Was Discovered 50 Years Ago. *Curr Top Microbiol Immunol* 390:3–15, 2015. DOI:10.1007/978-3-319-22822-8\_1 | PMID: 26424640.
- [8] Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr Virus–Associated Diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 1:375–404, 2006. DOI:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100209 | PMID: 18039120.
- [9] Tsao SW, Yip YL, Tsang CM, Pang PS, Lau VMY, Zhang G, et al. Etiological factors of nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol* 50:330–8, 2014. DOI:10.1016/j.oraloncology.2014.02.006
- [10] Busson P, Keryer C, Ooka T, Corbex M. EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: from epidemiology to virus-targeting strategies. *Trends Microbiol* 12:356–60, 2004. DOI:10.1016/j.tim.2004.06.005
- [11] Tsao SW, Tsang CM, Lo KW. Epstein–Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 372, 2017. DOI:10.1098/rstb.2016.0270 | PMID: 28893937; PMCID: PMC5597737.
- [12] Rickinson AB. Co-infections, inflammation and oncogenesis: future directions for EBV research. *Semin Cancer Biol* 26:99–115, 2014. DOI:10.1016/j.semcancer.2014.04.004 | PMID: 24751797.
- [13] Shannon-Lowe C, Rickinson AB, Bell AI. Epstein–Barr virus-associated lymphomas. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 372, 2017. DOI:10.1098/rstb.2016.0271 | PMID: 28893938; PMCID: PMC5597738.
- [14] Vedham V, Verma M, Mahabir S. Early-life exposures to infectious agents and later cancer development. *Cancer Med* 4:1908–22, 2015. DOI:10.1002/cam4.538
- [15] Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky T, Longnecker R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol* 9:369–81, 2011. DOI:10.1038/nrmicro2548 | PMID: 21478902; PMCID: PMC3242325.
- [16] Gauffre A, Viron A, Barel M, Hermann J, Puvion E, Frade R. Nuclear localization of the epstein-barr virus/c3d receptor (CR2) in the human burkitt b lymphoma cell, raji. *Mol Immunol* 29:1113–20, 1992. DOI:10.1016/0161-5890(92)90044-X
- [17] Hjalgrim H, Friborg J, Melbye M. The epidemiology of EBV and its association with malignant disease. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS,

- 
- Roizman B, Whitley R, et al., editors. Hum. Herpesviruses Biol. Ther. Immunoprophyl., Cambridge: Cambridge University Press, 2007. | PMID: 21348109.
- [18] Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. | PMID: 21348071.
- [19] Murata T. Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency: EBV reactivation of EB virus from latency. *Microbiol Immunol* 58:307–17, 2014. DOI:10.1111/1348-0421.12155
- [20] Murata T, Tsurumi T. Switching of EBV cycles between latent and lytic states. *Rev Med Virol* 24:142–53, 2014. DOI:10.1002/rmv.1780 | PMID: 24339346.
- [21] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum World Health Organ Int Agency Res Cancer* 100:1–441, 2012. | PMID: 23189750.
- [22] Elgui de Oliveira D. DNA viruses in human cancer: An integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett* 247:182–96, 2007. DOI:10.1016/j.canlet.2006.05.010
- [23] Iwakiri D. Multifunctional non-coding Epstein-Barr virus encoded RNAs (EBERs) contribute to viral pathogenesis. *Virus Res* 212:30–8, 2016. DOI:10.1016/j.virusres.2015.08.007
- [24] Smith D, Sugden B. Potential Cellular Functions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) of Epstein-Barr Virus. *Viruses* 5:226–40, 2013. DOI:10.3390/v5010226
- [25] Peng R, Moses SC, Tan J, Kremmer E, Ling PD. The Epstein-Barr Virus EBNA-LP Protein Preferentially Coactivates EBNA2-Mediated Stimulation of Latent Membrane Proteins Expressed from the Viral Divergent Promoter. *J Virol* 79:4492–505, 2005. DOI:10.1128/JVI.79.7.4492-4505.2005
- [26] Hiscott J, Kwon H, Génin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- $\kappa$ B pathway. *J Clin Invest* 107:143–51, 2001. | PMID: 11160127; PMCID: PMC199181.
- [27] Dawson CW, Port RJ, Young LS. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin Cancer Biol* 22:144–53, 2012. DOI:10.1016/j.semcancer.2012.01.004
- [28] Al-Mozaini M, Bodelon G, Karstegl CE, Jin B, Al-Ahdal M, Farrell PJ. Epstein-Barr virus BART gene expression. *J Gen Virol* 90:307–16, 2009. DOI:10.1099/vir.0.006551-0
- [29] Karran L, Gao Y, Smith PR, Griffin BE. Expression of a family of complementary-strand transcripts in Epstein-Barr virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8058–62, 1992. | PMID: 1325642; PMCID: PMC49855.
- [30] Tsao S-W, Tsang CM, To K-F, Lo K-W. The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol* 235:323–33, 2015. DOI:10.1002/path.4448 | PMID: 25251730; PMCID: PMC4280676.
- [31] Yamamoto T, Iwatsuki K. Diversity of Epstein-Barr virus BamHI-A rightward transcripts and their expression patterns in lytic and latent infections. *J Med Microbiol* 61:1445–53, 2012. DOI:10.1099/jmm.0.044727-0 | PMID: 22700548.
- [32] Li A, Zhang X-S, Jiang J-H, Wang H-H, Liu X-Q, Pan Z-G, et al. Transcriptional expression of RPMS1 in nasopharyngeal carcinoma and its oncogenic potential. *Cell Cycle Georget Tex* 4:304–9, 2005. | PMID: 15725729.
- [33] Feng F-T, Cui Q, Liu W-S, Guo Y-M, Feng Q-S, Chen L-Z, et al. A single nucleotide polymorphism in the Epstein-Barr virus genome is strongly associated with a high risk of nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer* 34:563–72, 2015. DOI:10.1186/s40880-015-0073-z | PMID: 26675171; PMCID: PMC4699395.
-

- 
- [34] Cui Q, Feng F-T, Xu M, Liu W-S, Yao Y-Y, Xie S-H, et al. Nasopharyngeal carcinoma risk prediction via salivary detection of host and Epstein-Barr virus genetic variants. *Oncotarget*, 2016. DOI:10.18632/oncotarget.11144 | PMID: 27517745.
- [35] Wu S, Liu W, Li H, Zhao Z, Yang Y, Xiao H, et al. Conservation and polymorphism of EBV RPMS1 gene in EBV-associated tumors and healthy individuals from endemic and non-endemic nasopharyngeal carcinoma areas in China. *Virus Res* 250:75–80, 2018. DOI:10.1016/j.virusres.2018.04.009 | PMID: 29665370.
- [36] Zhang J, Chen H, Weinmaster G, Hayward SD. Epstein-Barr Virus BamHI-A Rightward Transcript-Encoded RPMS Protein Interacts with the CBF1-Associated Corepressor CIR To Negatively Regulate the Activity of EBNA2 and Notch1C. *J Virol* 75:2946–56, 2001. DOI:10.1128/JVI.75.6.2946-2956.2001 | PMID: 11222720; PMCID: PMC115921.
- [37] Smith PR, de Jesus O, Turner D, Hollyoake M, Karstegl CE, Griffin BE, et al. Structure and coding content of CST (BART) family RNAs of Epstein-Barr virus. *J Virol* 74:3082–92, 2000. | PMID: 10708423; PMCID: PMC111807.
- [38] Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* 11:338–51, 2011. DOI:10.1038/nrc3035 | PMID: 21508972.
- [39] Hsieh JJ, Zhou S, Chen L, Young DB, Hayward SD. CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:23–8, 1999. | PMID: 9874765; PMCID: PMC15086.
- [40] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol* 36:59–72, 1977. DOI:10.1099/0022-1317-36-1-59
- [41] Li HM, Man C, Jin Y, Deng W, Yip YL, Feng HC, et al. Molecular and cytogenetic changes involved in the immortalization of nasopharyngeal epithelial cells by telomerase. *Int J Cancer* 119:1567–76, 2006. DOI:10.1002/ijc.22032 | PMID: 16688717.
- [42] Chan SY-Y, Choy K-W, Tsao S-W, Tao Q, Tang T, Chung GT-Y, et al. Authentication of nasopharyngeal carcinoma tumor lines. *Int J Cancer* 122:2169–71, 2008. DOI:10.1002/ijc.23374 | PMID: 18196576.
- [43] Guasparri I, Bubman D, Cesarman E. EBV LMP2A affects LMP1-mediated NF-kappaB signaling and survival of lymphoma cells by regulating TRAF2 expression. *Blood* 111:3813–20, 2008. DOI:10.1182/blood-2007-03-080309 | PMID: 18230756; PMCID: PMC2275034.
- [44] Fan W, Bubman D, Chadburn A, Harrington WJ, Cesarman E, Knowles DM. Distinct subsets of primary effusion lymphoma can be identified based on their cellular gene expression profile and viral association. *J Virol* 79:1244–51, 2005. DOI:10.1128/JVI.79.2.1244-1251.2005 | PMID: 15613351; PMCID: PMC538532.
- [45] Keller SA, Hernandez-Hopkins D, Vider J, Ponomarev V, Hyjek E, Schattner EJ, et al. NF-kappaB is essential for the progression of KSHV- and EBV-infected lymphomas in vivo. *Blood* 107:3295–302, 2006. DOI:10.1182/blood-2005-07-2730 | PMID: 16380446; PMCID: PMC1432097.
- [46] Habeshaw G, Yao QY, Bell AI, Morton D, Rickinson AB. Epstein-barr virus nuclear antigen 1 sequences in endemic and sporadic Burkitt's lymphoma reflect virus strains prevalent in different geographic areas. *J Virol* 73:965–75, 1999. | PMID: 9882297; PMCID: PMC103916.
- [47] Klein G, Dombos L, Gothoskar B. Sensitivity of Epstein-Barr virus (EBV) producer and non-producer human lymphoblastoid cell lines to superinfection with EB-virus. *Int J Cancer* 10:44–57, 1972. DOI:10.1002/ijc.2910100108 | PMID: 4122458.
- [48] Maurer BA, Wilbert SM, Imamura T. Incidence of EB virus-containing cells in primary and secondary clones of several Burkitt lymphoma cell lines. *Cancer Res* 30:2870–5, 1970. | PMID: 4321974.
-

- 
- [49] McCormick KJ, Stenback WA, Trentin JJ, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, et al. Complement-fixation test for detection of herpes-like viruses in cell cultures of Burkitt's lymphoma. *J Virol* 3:525–7, 1969. | PMID: 5786183; PMCID: PMC375804.
- [50] Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin JS, Mumford D. An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology* 5:319–34, 1975. DOI:10.1159/000149930 | PMID: 181343.
- [51] Bairoch A. The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. *J Biomol Tech JBT* 29:25–38, 2018. DOI:10.7171/jbt.18-2902-002 | PMID: 29805321; PMCID: PMC5945021.
- [52] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101–8, 2008. DOI:10.1038/nprot.2008.73 | PMID: 18546601.
- [53] Kim D-H, Behlke MA, Rose SD, Chang M-S, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23:222–6, 2005. DOI:10.1038/nbt1051 | PMID: 15619617.
- [54] Weissgerber TL, Milic NM, Winham SJ, Garovic VD. Beyond bar and line graphs: time for a new data presentation paradigm. *PLoS Biol* 13:e1002128, 2015. DOI:10.1371/journal.pbio.1002128 | PMID: 25901488; PMCID: PMC4406565.
- [55] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529:490–5, 2016. DOI:10.1038/nature16526 | PMID: 26735016; PMCID: PMC4851738.
- [56] Toptan T, Abere B, Nalesnik MA, Swerdlow SH, Ranganathan S, Lee N, et al. Circular DNA tumor viruses make circular RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E8737–45, 2018. DOI:10.1073/pnas.1811728115 | PMID: 30150410; PMCID: PMC6140489.
- [57] Huang J-T, Chen J-N, Gong L-P, Bi Y-H, Liang J, Zhou L, et al. Identification of virus-encoded circular RNA. *Virology* 529:144–51, 2019. DOI:10.1016/j.virol.2019.01.014 | PMID: 30710798.
- [58] Ungerleider N, Concha M, Lin Z, Roberts C, Wang X, Cao S, et al. The Epstein Barr virus circRNAome. *PLoS Pathog* 14:e1007206, 2018. DOI:10.1371/journal.ppat.1007206 | PMID: 30080890; PMCID: PMC6095625.
- [59] Le Clorennec C, Ouk T-S, Youlyouz-Marfak I, Panteix S, Martin C-C, Rastelli J, et al. Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand-independent autoactivation of CD95/Fas with caspase 8-mediated apoptosis. *J Virol* 82:6721–33, 2008. DOI:10.1128/JVI.02250-07 | PMID: 18448526; PMCID: PMC2447067.
- [60] Kim H, Burassakarn A, Kang Y, Iizasa H, Yoshiyama H. A single nucleotide polymorphism in the BART promoter region of Epstein-Barr virus isolated from nasopharyngeal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.10.028 | PMID: 31606205.
-