

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos da edição de ebv-miR-BARTs do vírus de Epstein-Barr em
vias do checkpoint imune e linfomagenese em células de Linfoma de
Burkitt.

Amanda Rodrigues Marques da Silva

Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira

Dr. Brunno Felipe Ramos Caetano

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2023

AMANDA RODRIGUES MARQUES DA SILVA

Efeitos da edição de ebv-miR-BARTs do vírus de Epstein-Barr em vias do checkpoint imune e linfomagenese em células de Linfoma de Burkitt.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu e à Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista, como requisito parcial para obtenção do diploma de graduação e título em Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira.

BOTUCATU - SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB

Rodrigues Marques da Silva, Amanda.

Efeitos da edição de ebv-miR-BARTs do vírus de Epstein-Barr em vias do checkpoint imune e linfomagenese em células de Linfoma de Burkitt / Amanda Rodrigues Marques da Silva. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

Capes: 20804008

1. Linfoma de Burkitt. 2. Infecções por Vírus Epstein-Barr. 3. Herpesvirus Humano 4.

Palavras-chave: Linfoma de Burkitt; Vírus de Epstein-Barr; miR-BARTs.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família que tanto amo, especialmente minha mãe Fabíola e meu pai Amilton que sempre estiveram me apoiando. Agradeço também à minha irmã que sei que é alguém que me apoia e sempre posso contar.

Agradeço à cada um dos meus amigos que encontrei nessa linda jornada da vida, que me ajudaram a trilhar caminhos que me tornaram quem sou. Um agradecimento especial à minha querida comadre Mariáh e meu compadre Diogo que me deram o presente mais incrível que já recebi, este que é ser madrinha da Lara. Agradeço aos meus amigos que tanto amo e que a faculdade me trouxe, eles deixaram tudo mais leve e foram grandes incentivadores nessa fase que é tão importante na vida. Larissa (Lari), Leonardo (Raio de sol), Gustavo (Gu), Ana Carolina (Fifty), Victória (Shazan), Rômulo, Camila (Cams), Julyane, Beatrice e tantas outras pessoas que participaram dessa etapa, só tenho a agradecê-los. Preciso dizer obrigada à turma 54, minha sala do coração.

Deixo um agradecimento ao Congresso de Biociências, à Liga do Câncer, Médicos da Alegria, ENBM, projetos de extensão que foram extremamente importantes durante a faculdade. Agradeço principalmente ao Cursinho Atena e ao Centro de Voluntariado Universitário (CVU), dois projetos que possuem meu coração, são projetos onde encontrei pessoas que se tornaram como família, projetos que cresci e me desenvolvi, onde tive amor e vivi momentos e experiências que eu nunca poderia nem sequer sonhar.

Agradeço ao melhor orientador do mundo todo, o professor doutor Deilson Elgui de Oliveira, as palavras são poucas para descrever todo o carinho e agradecimento que tenho por ele. Uma pessoa incrível que eu sempre soube que podia contar, que compartilhou experiências e me ensinou e me apoiou em meus sonhos. Agradeço também ao Brunno, o melhor co-orientador que eu poderia ter, que me ensinou e ajudou em todos os momentos no laboratório.

Agradeço a todos os professores que tive em minha vida, sem vocês, nada disso seria possível. Por fim, agradeço à minha criança interior que depois de tantos acontecimentos, finalmente está crescendo e se tornando quem sempre sonhou.

**“Efeitos da edição de ebv-miR-BARTs do vírus de Epstein-Barr em vias do checkpoint
imune e linfomagenese em células de Linfoma de Burkitt.”**

Sumário

1. Resumo	6
2. Introdução	7
2.1 Cânceres: generalidades	7
2.2. Infecções e câncer	8
2.3 Linfoma de Burkitt.....	9
2.4 Vírus de Epstein-Barr	10
2.5 EBV miR-BARTs	11
3. Objetivos.....	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos	13
4. Metodologia.....	14
5. Resultados.....	16
6. Discussão	18
7. Conclusão	19
8. Referências bibliográficas	20

1. Resumo

O presente trabalho apresenta sobre os efeitos da edição de ebv-miR-BARTs do vírus de Epstein-Barr em vias do checkpoint imune e linfomagenese em células de Linfoma de Burkitt. O objetivo será investigar os efeitos da supressão de miRNAs virais em linhagens de células humanas infectadas pelo EBV (genoma selvagem ou editado) em relação a diferentes parâmetros avaliados in vitro, tais como migração, clonogênese e expressão de genes do checkpoint imune. Para este presente trabalho foram usadas amostras para os experimentos da linhagem de células Akata-Cas9, ocorreu a extração do DNA e as linhagens de células EBV que foram positivas, foram submetidas à extração de RNA. As amostras foram tratadas para RT-PCR e, delas, foi produzido o cDNA. Na etapa de clonagem, foram usados construtos para a expressão de RNAs guias dirigidos aos miR-BART-7 e miR-BART-9. O vetor foi purificado e utilizado para a transformação da bactéria DH5 α , uma cepa de *E. coli*. As colônias antibiótico resistente foram crescidas e submetidas à PCR colony e sequenciamento.

Com base nestas informações, espera-se ao final deste estudo contribuir no entendimento da importância dos miR-BARTs 7 e 9 do EBV na manutenção do fenótipo maligno e modulação de vias de sinalização intracelular envolvidas na linfomagenese.

Palavras-chave: Linfoma de Burkitt, vírus de Epstein-Barr, miR-BARTs

2. Introdução

2.1 Cânceres: generalidades

Câncer é um termo que abrange mais de 100 tipos diferentes de doenças malignas que possuem um crescimento desordenado de células e a capacidade de disseminar-se entre órgãos e tecidos adjacentes à estrutura afetada inicialmente (BATISTA; MATTOS; SILVA, 2015). Os cânceres possuem características biológicas em comum em várias etapas durante seu desenvolvimento, são elas: a resistência aos sinais inibitórios, o comprometimento de mecanismo de morte celular programada, a autonomia na geração de sinais tróficos, o remodelamento vascular onde se inclui a angiogênese, o potencial de replicação ilimitado, o potencial invasivo e para a disseminação, a indução de inflamação associada ao tumor, a subversão da resposta imunitária, alterações no metabolismo e a instabilidade genética. (CAETANO; DE OLIVEIRA, 2018).

O câncer é a segunda maior causa de morte e causadora de sequelas e expectativa de anos de vida saudável reduzidos (FITZMAURICE et al., 2019);

O câncer pode ser considerado a segunda maior causa de morte que causa sequelas e diminui a expectativa de anos saudáveis (FITZMAURICE et al., 2019). O número de casos de câncer tem aumentado consideravelmente no mundo todo, principalmente a partir do século passado, levando-o a ser considerado um problema de saúde pública mundial (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, segundo dados da OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde), sendo essa doença também responsável por uma a cada seis mortes.

No mundo, os países de baixa e média renda possuem aproximadamente 70% das mortes por câncer (“Câncer - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde”, [s.d.]; “Câncer - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde”, [s.d.]). Já no Brasil, considerado um país de grande heterogeneidade e que possui grande dimensão territorial, há um perfil de incidência que reflete países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo assim, são esperados 704 mil novos casos de câncer para o triênio 2023-2025. (SANTOS et al., 2023).

2.2. Infecções e câncer

Apesar de ser uma doença multifatorial, as causas para o câncer podem estar associadas a fatores, ambientais, genéticos, socioeconômicos, estilo de vida, envelhecimento, entre outros. A formação do câncer, segundo a OMS, é o resultado da interação entre fatores genéticos do indivíduo e agentes externos que podem ser classificados em físicos, químicos e biológicos.

Quadro 1 – Exemplos de agentes externos

Agentes externos	Exemplos
Químicos	Radiação ionizante e ultravioleta
Físicos	Amianto, arsênio e componentes do fumo
Biológicos	Vírus, bactérias e parasitas.

Algumas infecções crônicas causadas pelos agentes biológicos são fatores de risco para o desenvolvimento de determinados tipos de câncer. (DE CARVALHO; COSTA; FRANÇA, 2019). Segundo dados da OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde), aproximadamente 15% dos cânceres diagnosticados em 2012 foram atribuídos a infecções carcinogênicas.

A Agência Internacional de pesquisa sobre cânceres (IARC – International Agency of Research on Cancer) são considerados como agentes infecciosos carcinogênicos em humanos o *Helicobacter pylori*, o vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV), o papilomavírus humano (HPV; tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 — conhecidos coletivamente como tipos de alto risco), o vírus *Epstein-Barr* (EBV), o herpesvírus humano tipo 8 associado ao sarcoma de Kaposi (HHV-8), vírus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1), o *Opisthorchis viverrini*, o *Clonorchis sinensis* e o *Schistosoma haematobium*. (“Cânceres Atribuíveis a Infecções”, [s.d.])

A infecção pelos agentes infecciosos é necessária, mas é insuficiente para o desenvolvimento do câncer. Porém, os vírus cancerígenos podem atuar na carcinogênese por vários mecanismos, dentre eles a desregulação de processos celulares pela ação de proteínas virais, pelo dano direto no DNA e mutagênese pela inserção e integração viral ao genoma do hospedeiro e por estratégias de imunoevasão. É importante ressaltar que foi somente na década de 1950, com a descoberta do EBV em células do linfoma de Burkitt, que surgiram evidências conclusivas que os vírus de DNA desempenham um papel na patogênese de alguns cânceres humanos (ELGUI DE OLIVEIRA, 2007).

2.3 Linfoma de Burkitt

Entre os tipos de câncer, existem as neoplasias hematológicas que são doenças que se expressam em alterações localizadas no sangue ou em tecidos que formam o mesmo (CALEFI et al., 2014). As neoplasias hematológicas, mais conhecidas como linfomas, leucemias e síndromes mielodisplásicas, possuem importante relevância clínica por serem importantes causas de morte na infância e adolescência (ARAÚJO et al., 2022).

Nos linfomas, há transformações de células linfóides normais para células neoplásicas, as primeiras sendo responsáveis pela proteção contra infecções e doenças. Entre 2010 e 2020, foram diagnosticados pelo SUS (Sistema Único de Saúde) um total de 91.468 novos casos de linfomas. (MANCINI, 2022).

A doença é morfológicamente dividida em dois grupos, o primeiro é o Linfoma Hodgkin (LH) e o segundo é o Linfoma não-hodgkin (LNH). O Linfoma não-Hodgkin é um grupo de neoplasias hematológicas provenientes do tecido linfóide, local onde células imunológicas habitam e são responsáveis por combater doenças. (SARTOR; GRANEMANN, 2019)

Um tipo de linfoma não-Hodgkin, que representa cerca de 40% dos LNH que ocorrem na infância, é o Linfoma de Burkitt (LB), uma neoplasia de células B altamente agressiva e que ocorre em todas as idades, mas é mais comum na infância em crianças entre 2 e 14 anos de idade, em que os meninos são mais afetados que as meninas (MELO; YURGEL; LORANDI, 1997).

O LB foi caracterizado inicialmente em Uganda, na África, é diagnosticado principalmente em crianças e jovens e, por ser uma neoplasia de crescimento rápido, exige diagnóstico e tratamento imediatos. Descrito pela OMS como um tumor do centro germinativo do tecido linfóide, é um linfoma de pequenas células não clivadas, além de ser uma forma agressiva de LNH de células B com alta taxa de proliferação celular. É caracterizado pela ocorrência de múltiplos tumores envolvendo várias partes do corpo.

Dados epidemiológicos de 2017 mostraram ocorreram 5.123 óbitos por linfoma Hodgkin e não Hodgkin no Brasil.(ARAÚJO et al., 2022). O LB é provavelmente a neoplasia maligna que afeta os humanos com o crescimento mais rápido (AFANAS et al., 2011, p. 20) e, frequentemente, é associada com o vírus EBV, este que é encontrado em quase todos os casos de LB.

O linfoma de Burkitt possui três formas clínicas reconhecidas: endêmica, esporádica e a associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. As formas endêmicas (africana) e esporádicas são variantes clínicas do LB que vão diferir geograficamente, essa forma de

linfoma não-Hodgkin foi descrito na África Tropical, mas ocorre no Brasil também. O LB esporádico tem prevalência nos Estados Unidos e Europa Ocidental. O LB endêmico ocorre na África equatorial e, em quase todos os casos do linfoma, é encontrado o vírus de Epstein-Barr. (AFANAS et al., 2011). Na forma esporádica, o genoma viral é encontrado em apenas 15 a 20% dos tumores. Nas duas formas ocorre a translocação t(8:14) que resulta na ativação do gene MYC (FILHO, G. B. B., 2021). São indistinguíveis histologicamente todas as formas do Linfoma de Burkitt, mas elas se caracterizam por estarem associadas em translocações específicas que promovem a desregulação do gene que codifica MYC, levando a sua super expressão e conduzindo à proliferação neoplásica (SANTOS; DANDA; TEIXEIRA, 2015).

2.4 Vírus de Epstein-Barr

O vírus de Epstein-Barr é mais conhecido pela denominação inglesa Epstein-Barr Vírus (EBV), descoberto em amostras de Denis Burkitt em 1964, foi descrito pela primeira vez em 1965 após estudos através da microscopia eletrônica pelos patologistas britânicos Michael Epstein, Yvonne Barr e Bert Achong. Dennis Burkitt sugeriu uma relação entre a prevalência do tumor do linfoma com algum agente biológico, este que implicasse na disseminação do linfoma. Epstein e outros patologistas passaram a investigar na Inglaterra a presença de um vírus oncogênica nas amostras enviadas por Burkitt e, após um cultivo “in vitro” de células tumorais, foi detectada a presença de um vírus do grupo Herpes em pequena proporção nos linfócitos que estavam em cultura, a este vírus deu-se a denominação de Epstein-Barr (VEB). (PANNUTI, 1981)

O diferencial do vírus do EBV em relação aos herpes vírus conhecidos na época é que ele era capaz de se replicar em células de culturas convencionais. Formalmente designado como herpesvírus4 (HHV-4), é membro da família Herpesviridae, agente da mononucleose infecciosa e apresenta uma infecção latente, ou seja, não é eliminado do organismo, apesar da resolução clínica da doença. (DE OLIVEIRA et al., 2012).

A partícula viral infecciosa do EBV possui três componentes, são eles o nucleóide, o capsídeo e o envelope. O genoma do EBV possui uma molécula de DNA de fita dupla com aproximadamente 184.000 pares de bases. (DE OLIVEIRA et al., 2012). Foi somente em 1968, quatro após sua descoberta que foi associada a infecção por EBV com a mononucleose infecciosa (MI), demonstrando que o EBV era o agente etiológico da doença. (RIBEIRO-SILVA; ZUCOLOTO, 2003). O EBV foi o primeiro vírus a expressar miRNAs e, sua infecção latente, pode estar associada ao desenvolvimento neoplasias malignas, como é o caso do

Linfoma de Burkitt. A associação entre LB e EBV ocorre em frequências variadas, o genoma do EBV é detectado em quase todos os casos de LB endêmicos (98%) (SOUZA, 2012), mesmo nos casos de LB esporádico ainda há associação com o EBV (MAZZOCCOLI, 2017).

O EBV infecta mais de 90% da população mundial e sua taxa de endemicidade varia de acordo com a região geográfica, sendo elevada no norte da África. No Brasil, possui endemicidade intermediária. Há uma prevalência da associação de Linfoma de Burkitt endêmico e vírus de Epstein-Barr em áreas de baixo poder socioeconômico e de infecção precoce pelo EBV, mas o mecanismo exato pelo qual o EBV promove a oncogênese ainda é mecanismo de discussão. (DE FALCO et al., 2009).

2.5 EBV miR-BARTs

Os microRNAs (miRNAs) são uma família de pequenas moléculas de RNA codificantes que desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica, eles regulam negativamente a expressão de genes codificadores de proteínas e fazem parte de diversos processos celulares (HSU et al., 2014). Os miRNAs possuem papel crucial nos principais processos biológicos e no desenvolvimento do câncer. Alguns miRNAs estão envolvidos na diferenciação de células B e podem ser considerados marcadores específicos. (JARDIN; FIGEAC, 2013).

A expressão de miRNAs do EBV altera a homeostase celular e coopera para a tumorigênese do LB (ROBAINA, 2016). Os miRNAs do EBV também são importantes para a manutenção da infecção persistente, pois reduzem os efeitos citopáticos associados a expressão de determinados produtos virais e modulam vias de sobrevivência celular e resistência a apoptose. (CAETANO; DE OLIVEIRA, 2018)

Dentre os RNAs codificados pelo EBV, existem os miR-BARTs, que regulam diversas vias oncogênicas, regulam negativamente a expressão de transcritos responsáveis pelo ciclo lítico, são responsáveis pela evasão celular, além de contribuírem significativamente para a indução de perfis de expressão gênica associados ao crescimento e sobrevivência celular. (CAETANO; DE OLIVEIRA, 2018).

Há dois miR-BARTs que são importantes de serem destacados, são eles o miR-BART 7 cuja super expressão no NPC regula a expressão do produto do gene supressor tumoral PTEN. E o outro, é o miR-BART9, que regula a expressão da oncoproteína viral LMP1 e de caderina E celular. Por regularem a expressão dessas proteínas, esses dois miR-BARTs são importantes

para a progressão e sobrevivência dos cânceres de origem epitelial, pois atuam na transição epitelial-mesenquimal. (ROCHA, 2022).

Desta forma, levando em relevância os dados apresentados e a importância de estudos sobre o Linfoma de Burkitt e sua associação com o EBV, o presente trabalho abordará o tema apresentado.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente estudo visa avaliar a hipótese de que a supressão dos miRNAs virais causam efeitos em linhagens de células humanas infectadas pelo EBV e avaliar o impacto da supressão de miRNAs virais na modulação de vias de sinalização intracelular fundamentais envolvidas na linfomagenese.

3.2 Objetivos específicos

1. Investigar os efeitos da supressão de miRNAs virais em linhagens de células humanas infectadas pelo EBV (genoma selvagem ou editado) em relação a diferentes parâmetros avaliados in vitro, tais como migração, clonogênese e expressão de genes do checkpoint imune
2. Avaliar o impacto da supressão de miRNAs virais na modulação de vias de sinalização intracelular fundamentais envolvidas na linfomagenese.

4. Metodologia

Para este presente trabalho foram usadas amostras para os experimentos da linhagem de células Akata-Cas9, disponível no Instituto de Biotecnologia (IBTEC), UNESP. As linhagens celulares de Akata disponíveis foram cedidas pelo Prof. Dr. Benjamin Gewurz, da Universidade de Harvard, Boston, MA, USA. As células foram revalidadas previamente quanto à autenticidade genética por meio de análises de repetições curtas em tandem (Short tandem Repeats – STRs) e certificadas como livres de contaminação por *Mycoplasma sp.* através de procedimentos de rotina em estudos que são conduzidos pelo Grupo de Estudos em Carcinogênese Viral e Biologia dos Cânceres (Virican).

As células foram cultivadas com aditivos e meios de cultivo apropriados para a linhagem, acrescidos de gentamicina para controle biológico. Elas também passaram por subcultivo e monitoramento de viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do corante azul de tripan e por análise morfológica em microscópio óptico invertido.

Aproximadamente $1,0 \times 10^6$ das células foram utilizadas para extração de DNA. A extração de DNA em células Akata WT foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi eluído em solução de reidratação (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=7) e quantificado em NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Foi realizado um PCR das amostras e o produto de PCR foi encaminhado a serviço especializado do IBTEC, UNESP, para sequenciamento de DNA pelo método Sanger.

As linhagens de células EBV que foram positivas, foram submetidas à extração de RNA utilizando o sistema RNeasy Plus Mini seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado em NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA), trocando na máquina para RNA e a calibração foi feita com Nuclease Free Water. As amostras foram submetidas ao tratamento para RT-PCR com DNase I sendo as amostras incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente, após isso foi utilizado 1 µL de DNase Stop Solution e incubado a 70°C por 10 minutos, as amostras foram guardadas a -80°C até seu uso.

A produção do cDNA foi feita da seguinte forma, foram adicionados 9 µL do RNA das amostras tratado com DNase e 1 µL de oligo DT, em seguida foi incubado a 70°C por 5 minutos e depois esfriado em gelo a 4°C por 5 minutos. O mixer do PCR foi então adicionado sendo 1,5 µL de H₂O, 4 µL de Buffer GO script, 2 µL de MgCl₂, 1 µL de mix nucleotídeos, 0,5 µL de

RNAasin e 1 μ L da enzima Go-script. Após, foi realizada a quantificação do cDNA das amostras no NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) e realizada a diluição para 100 ng/ μ L.

O qPCR foi realizado com as seguintes tratamentos B75p, B75p SCR, B95p e B95p SCR e uma controle de AKATA WT. Os alvos para EBV foram o LMP1 e o RPMS1 e os endógenos foram o HPRT e o RPS13. A reação foi composta por 5 μ L de GoTAC, 3 μ L de H₂O, 0,5 μ L de Primer F, 0,5 μ L de primer R, 2 μ L do endógeno e 1 μ L do tratamento. A ciclagem se iniciou a 95°C por 2 min, 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min, 95°C por 30 seg, 65°C por 30 seg e 95°C por 30 seg. O resultado foi analisado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e o cDNA da linhagem que apresentou os maiores níveis dos endógenos, serão utilizados para clonagem.

Na etapa da clonagem e geração de vetores, ocorreu a produção de construtos para a expressão de RNAs guias utilizados dirigidos aos miR-BART-7 e miR-BART-9. O vetor Lenti-PuroGuide foi utilizado para a clonagem convencional da sequência de sgRNA utilizando a enzima de restrição BsmBI, que contém uma sequência para a expressão e um gene de resistência para seleção eucariótica com o antibiótico puromicina, esse vetor já estava pronto no laboratório.

O vetor foi purificado e utilizado para a transformação da bactérias DH5 α uma cepa de *E. coli* competente Stbl3® (Thermo Fisher). Em suma, foi adicionado 5 μ L do vetor purificado em 25 μ L das bactérias competentes Stbl3®, elas ficaram incubadas por 30 minutos em gelo e, foram tratadas com choque térmico por 40 segundos a 42°C, em seguida foram colocadas no gelo por 2 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 200 μ L de SOC1 nas bactérias e, elas cresceram por uma hora até serem inoculada. As células transformadas foram inoculadas para um meio sólido de 250 ml de ágar Luria-Bertani (LB) com a adição 250 μ L de ampicilina no meio, pois dessa forma ocorre o crescimento apenas de colônias antibiótico-resistentes, as células foram incubadas a 37°C overnight.

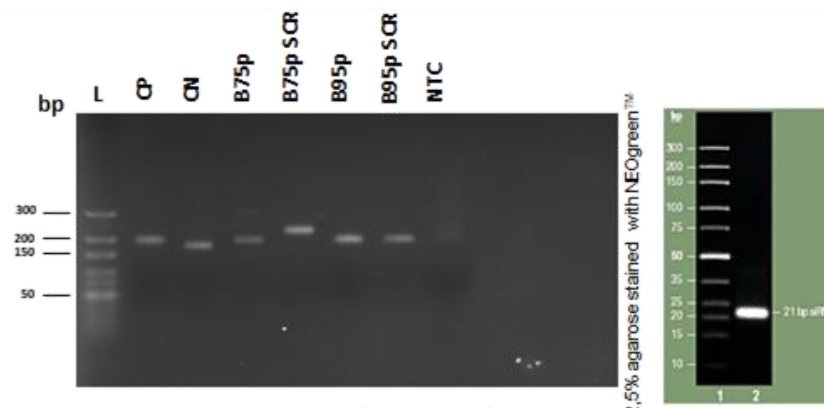
Após o crescimento, algumas colônias foram selecionadas para o crescimento e purificadas em meio LB líquido através do sistema QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) e a quantificação foi realizada através do quantificado em NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Também foi realizado o PCR colony após o crescimento das colônias bacterianas para confirmação que as colônias continham o inserto.

Foram selecionadas 2 colônias de cada construto para validação pelo método Sanger, elas foram isoladas e crescidas em meio LB líquido com 100 μ g/mL de ampicilina, elas foram colocadas no glicerol estoque e armazenadas a -80°C.

5. Resultados

Ao final dos experimentos foi realizada a produção lentiviral e transdução em células Akata EBV-positiva. A figura 1 representa o resultado da PCR após a realização do MiniPrep.

Figura 1 – Resultado da eletroforese em gel de agarose após PCR



As amostras da figura 4, foram submetidas ao PCR colony. Foram selecionadas as colônias 1 e enviadas para o sequenciamento, conforme a figura 2, o sequenciamento obteve êxito e os vetores foram incluídos na bactéria. A figura 3 apresenta a amostra B75p SCR, cujo vetor se ligou ao contrário.

Figura 2 – Sequenciamento das amostras B75p, B95p e B95pSCR

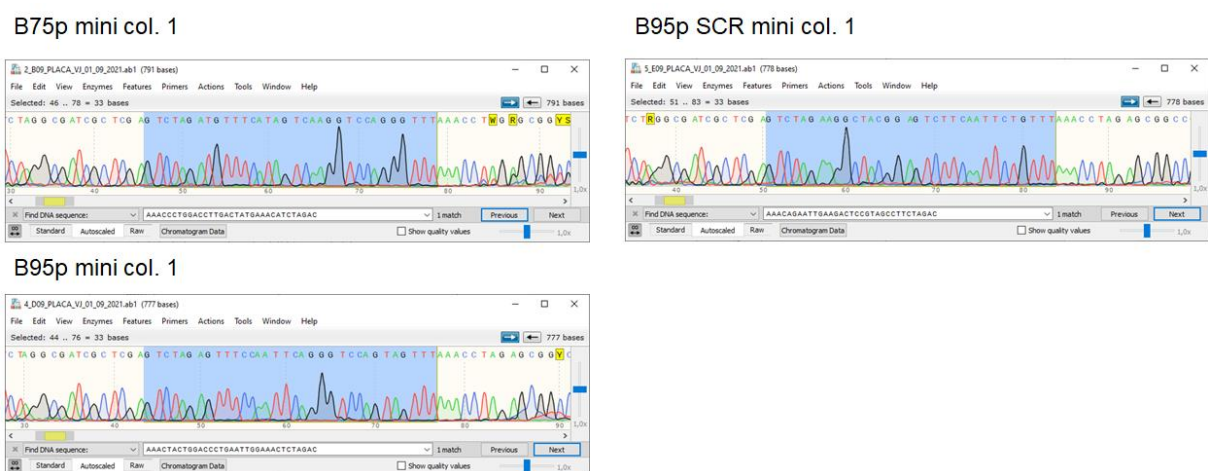
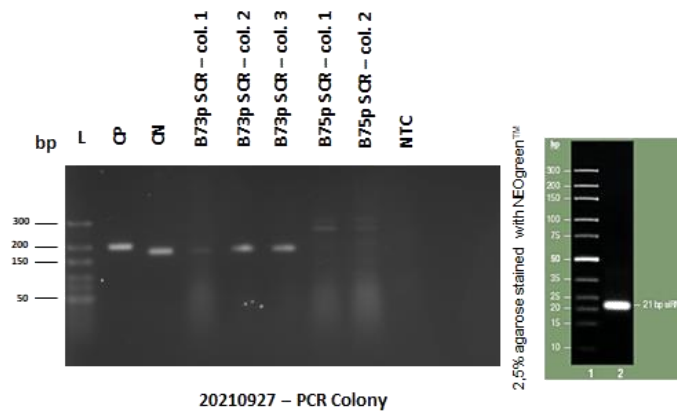


Figura 3 – Sequenciamento da amostra B75p SCR

B75p SCR mini col. 1

**Figura 4** – PCR colony

Uma grande dificuldade encontrada no presente trabalho foi no qPCR, este que foi refeito por várias vezes por conta das amostras que não amplificavam. Primers novos foram utilizados e, mesmo assim, tinham resultados imprecisos, conforme mostra a figura 5 que é o resultado da última tentativa de qPCR.

Figura 5– Resultado do ΔC_T

12/12/2021			
RQ	Endógenos	LMP1	RPMS1
B7sg1	138,485457	8492,520284	1562,112
B7sg2	5,871574021	54,51628737	155,14786
B9sg1	1564968,183	1,521012126	Não amplificou
B9sg2	0,001574642	1,88022E-09	0,8630404

6. Discussão

Algumas etapas realizadas para esse presente trabalho mostraram-se proveitosas, como é o caso da clonagem que, apesar de ser realizada algumas vezes, mostrou-se eficiente e mostrou um resultado com o aparecimento das colônias antibiótico resistentes.

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, houve um momento de contaminação das células no laboratório e, após inúmeras limpezas e reinício dos cultivos celulares, a programação pode ser seguida, diminuindo assim o tempo dos experimentos. A viabilidade das células foram satisfatórias pois a AKATA WT apresentou pelo teste do azul de tripan uma viabilidade de 85%. Embora a metodologia utilizada já tenha sido utilizada em outros trabalhos, alguns ajustes precisaram ser realizados, o que aumentou o tempo de experimentação e bancada. Um exemplo foi a alteração para a troca do T4 DNA ligase com a quick ligase para ser utilizado no plaqueamento das bactérias.

O presente estudo buscava avaliar a hipótese de que a supressão dos miRNAs virais causam efeitos em linhagens de células humanas infectadas pelo EBV e avaliar os impactos da supressão de mi RNAs virais na modulação de vias de sinalização intracelular fundamentais envolvidas na linfomagenese, através dele não foi possível. Por fim, o laboratório é um local para experiências, com erros e acertos, não existe uma receita que seguindo à risca se terá um resultado exatamente igual ao anterior.

7. Conclusão

Em síntese, é fato que há uma associação entre o Linfoma de Burkitt, principalmente o endêmico, com o vírus de Epstein-Barr e o mecanismo pelo qual o EBV promove a oncogênese é pauta para discussão. Sabendo que o EBV é detectado em quase todos os casos de Linfoma de Burkitt endêmicos, ela torna-se uma doença que necessita de um conhecimento de seus pormenores para que pesquisas futuras proporcionem os melhores tratamentos com eficácia.

Com o conhecimento prévio em expansão de que o EBV possui um papel multifacetado em doenças benignas e malignas (FUGL; ANDERSEN, 2019), o tema proposto do presente trabalho é de importância no assunto. Durante os experimentos foi possível acompanhar e aprender as diferentes técnicas laboratoriais e, apesar de experimentos que não funcionaram, como a qPCR que não amplificava, outras etapas foram realizadas com êxito, como o cultivo celular e a clonagem.

8. Referências bibliográficas

1. AFANAS, N. et al. Linfoma de Burkitt. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. 5, p. 735–8, 2011.
2. ARAÚJO, L. G. L. et al. Perfil Demográfico e Clínico de Casos de Neoplasias Hematológicas em Crianças e Adolescentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 68, n. 2, p. e-242356, 22 jun. 2022.
3. BATISTA, D. R. R.; MATTOS, M. DE; SILVA, S. F. DA. Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Enfermagem da UFSM**, v. 5, n. 3, p. 499–510, 1 out. 2015.
4. CAETANO, B. F. R.; DE OLIVEIRA, D. E. Efeitos de miR-BARTs do vírus de Epstein-Barr nas propriedades in vitro de células derivadas de linfomas humanos e na modulação de vias de sinalização intracelular envolvidas na linfomagenese. 2018.
5. CALEFI, K. A. C. et al. Qualidade de vida do paciente com neoplasia hematológica submetido à quimioterapia. **Reme: Revista Mineira de Enfermagem**, v. 18, n. 1, p. 41–47, mar. 2014.
6. DE CARVALHO, K. F.; COSTA, L. M. O.; FRANÇA, R. F. A RELAÇÃO ENTRE HPV E CÂNCER DE COLO DE ÚTERO: UM PANORAMA A PARTIR DA PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DA ÁREA. **Revista Saúde em Foco**, 2019.
7. DE FALCO, G. et al. Role of EBV in microRNA dysregulation in Burkitt lymphoma. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, n. 6, p. 401–406, 1 dez. 2009.
8. DE OLIVEIRA, J. L. et al. O vírus Epstein-Barr e a mononucleose infecciosa. 2012.
9. ELGUI DE OLIVEIRA, D. DNA viruses in human cancer: an integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 247, n. 2, p. 182–196, 18 mar. 2007.
10. Filho, Geraldo B. Bogliolo - Patologia . Disponível em: Minha Biblioteca, (10ª edição). Grupo GEN, 2021.

11. FUGL, A.; ANDERSEN, C. L. Epstein-Barr virus and its association with disease - a review of relevance to general practice. **BMC Family Practice**, v. 20, p. 62, 14 maio 2019.
12. GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. **JAMA oncology**, v. 5, n. 12, p. 1749–1768, 1 dez. 2019.
13. GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. DE M.; MENDONÇA, G. A. E S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227–234, 30 set. 2005.
14. HSU, C.-Y. et al. The Epstein-Barr Virus-Encoded MicroRNA MiR-BART9 Promotes Tumor Metastasis by Targeting E-Cadherin in Nasopharyngeal Carcinoma. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 2, p. e1003974, 27 fev. 2014.
15. IARC. **Cânceres Atribuíveis a Infecções**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/causes/infections/help>>. Acesso em: 9 jun. 2023.
16. JARDIN, F.; FIGEAC, M. MicroRNAs in lymphoma, from diagnosis to targeted therapy. **Current Opinion in Oncology**, v. 25, n. 5, p. 480, set. 2013.
17. MANCINI, N. **Estatísticas de linfoma no Brasil mostram cenário preocupante**. **Revista Online ABRALE**, 6 abr. 2022. Disponível em: <<https://revista.abrale.org.br/estatisticas-de-linfoma-no-brasil-mostram-cenario-preocupante/>>. Acesso em: 28 abr. 2023
18. MAZZOCCOLI, L. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. 2017.
19. MELO, R. E. V. A. DE; YURGEL, L. S.; LORANDI, C. S. Linfoma de Burkitt. **Rev. odontol ciênc**, p. 189–96, 1997.
20. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Câncer - OPAS/OMS** |. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>>. Acesso em: 28 abr. 2023.

21. PANNUTI, C. S. Soro-epidemiologia do vírus de Epstein-Barr (VEB). **Revista de Saúde Pública**, v. 15, p. 93–100, fev. 1981.
22. RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. O papel do vírus Epstein-Barr na tumorigênese humana. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 36, n. 1, p. 16–23, 30 mar. 2003.
23. ROCHA, V. L. Estabelecimento de modelo in vitro para estudo de efeitos de miRBARTs do EBV em células humanas de epitélio nasofaríngeo. 6 maio 2022.
24. SANTOS, I. G. P.; DANDA, T. F. Q.; TEIXEIRA, A. L. DE S. Aspectos clínicos e tomográficos do linfoma de Burkitt em paciente pediátrico - relato de caso. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v. 15, n. 2, p. 21–26, jun. 2015.
25. SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e-213700, 6 fev. 2023.
26. SARTOR, J.; GRANEMANN, M. Linfomas. Em: **Guia prático de hematologia: Liga Acadêmica de Hematologia da Região Carbonífera**. [s.l.] Unesc, 2019. p. 86–112.
27. SOUZA, M. T. D. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Coordenação de Pós-graduação Stricto sensu. 2012.