



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



Efeitos de variantes da proteína LMP1 do vírus de Epstein-Barr na regulação da transição Epitelial-Mesenquimal em células humanas *in vitro*

CLEITON SILVA MARQUES

Mestrando

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências - Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração Biologia de Parasitas e Microorganismos.

Botucatu, SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Efeitos de variantes da proteína LMP1 do vírus de Epstein-Barr
na regulação da transição Epitelial-Mesenquimal
em células humano *in vitro***

CLEITON SILVA MARQUES
Mestrando

Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira
Orientador

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências - Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração Biologia de Paraistas e Microrganismos.

Botucatu, SP
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO. DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU – UNESP BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Marques, Cleiton Silva

“Efeitos de variantes da proteína LMP1 do vírus de Epstein-Barr na regulação da transição Epitelial-Mesenquimal em células humano *in vitro*.” Cleiton Silva Marques, 2017

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2017

Orientador: Professor Dr. Deilson Elgui de Oliveira

Assunto CAPES: 20202008

1. GENÉTICA MOLECULAR E DE MICROORGANISMOS

Palavras-chave: Câncer, vírus de Epstein-Barr, transição epitelial-mesenquimal, proteína LMP1.

Agradecimentos

A minha amada esposa Sabrina Emílio Marques que aceitou o desafio de viver esse sonho comigo. Obrigado por fazer a minha vida melhor. Obrigado por existir. Obrigado por não me deixar a desistir dos meus sonhos.

Ao meu orientador Professor Dr. Deilson Elgui de Oliveira que aceitou o desafio de orientar um professor de biologia do ensino médio que estava longe dos laboratórios a muito tempo. Muito obrigado pela oportunidade de aprender um pouco mais;

Aos meus pais, Luzia das Graças Silva Marques e Joaquin Marques, que com lágrimas viram o primeiro dos seis filhos a se mudar para outra cidade.

Aos pais de minha esposa, Maristela Emílio Pasin e Frederico Pasin; obrigado por me incentivar a correr atrás desse sonho.

Aos meus irmãos Ricardo e Arilson Silva Marques, pelo incentivo e preocupação;

A Igreja Presbiteriana do Getsêmane e a Primeira igreja Batista em Botucatu, obrigado pelo acolhimento e fazer com que os nossos dias em Botucatu fossem melhores;

Aos amigos Thomaz e Aline, obrigado pela hospedagem. Não há palavras para descrever o que vocês fizeram por nós. Com certeza, a corrente do bem ganhou mais um elo;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento dessa pesquisa 2015-13939-9.

Ao Instituto de Biotecnologia – IBTEC, pela utilização dos laboratórios.

“Tudo o que é incompreensível, nem por isso deixa de existir.” Blaise Pascal

Sumário

1	RESUMO	13
2	INTRODUÇÃO	15
2.1	Infecção microbiana na etiopatogênese dos cânceres	15
2.2	Vírus de Epstein-Barr	17
2.2.1	Características gerais dos herpesvirus	17
2.3	Oncoproteína LMP1 do EBV.....	24
2.4	Carcinoma de nasofaringe	26
2.5	Progressão dos cânceres.....	28
2.6	Transição Epitelial-Mesenquimal.....	30
2.6.1	Marcadores de Transição Epitelial-Mesenquimal	32
2.7	LMP1 na progressão tumoral.....	38
3	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo geral.....	41
3.2	Objetivos específicos	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Construtos para expressão de LMP1 do EBV	42
4.2	Linhagens celulares e transfecção celular	43
4.3	Imunodeteção de EBV LMP1.....	45
4.4	Análise funcional dos vetores contendo as ORFs de LMP1	46
4.5	Viabilidade Celular	46
4.6	Estimativa das taxas de morte celular por apoptose	47
4.7	Estimativas de migração e invasão celular <i>in vitro</i>	47

4.8	Análise de expressão gênica em nível transcricional	48
4.9	Análise estatística	51
5	RESULTADOS.....	52
5.1	Expressão e atividade de EBV LMP1 nas células transfectadas transientemente	52
5.2	Viabilidade celular e apoptose.....	53
5.3	Migração e invasão celular in vitro	54
5.4	Análise de expressão gênica diferencial	56
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO.....	63
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	64
9.	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	76

Lista de Figuras

FIGURA 1 Microscopia eletrônica de células derivadas do linfoma de Burkitt. Em destaque, a partícula do vírus de Epstein-Bar observada pela primeira vez (Epstein et al. 1965)	19
FIGURA 2 –Infecção pelo EBV em humanos. Infecção Primária: O vírus infecta células da orofaringe, nas quais estabelece ciclo lítico (produtivo). As partículas virais difundem-se para o tecido linfóide adjacente e infectam linfócitos B, nas quais estabelecem infecção latente. Muitos linfócitos B infectados são identificados e eliminados pela resposta imunitária, mas alguns linfócitos infectados escapam e se estabelecem como repertório de células EBV-positivas com supressão de expressão de antígenos virais. Infecção persistente: Ocasionalmente, linfócitos B infectados podem ser requeridos em resposta imunitárias, o que deflagra diferentes programas de latência. Essas células podem retornar para o centro germinativo ou se diferenciar em plasmócitos, que se deslocam para regiões de mucosa da orofaringe, onde ocorre reativação do ciclo lítico. As novas partículas virais formadas podem infectar células epiteliais da orofaringe, ou linfócitos B, contribuindo para a manutenção da infecção persistente. No entanto, é provável que a maioria dessas células sejam removidas pela ação de linfócitos T. Adaptado de Young e Rickinson (Young and Rickinson 2004)	19
FIGURA 3 Diagrama do epissoma do EBV com a localização e sentido de transcrição de genes virais do ciclo latente (Murray and Young 2001).	21
FIGURA 4 Estrutura da proteína LMP1 doEBV. (Fielding et al. 2001)	24
FIGURA 5 Região Carboxi-Terminal. A sinalização de LMP1 resulta da habilidade dos domínios CTAR1 interagir diretamente com TRAFs ou de CTAR2 que interage indiretamente com TRAFs por meio da ativação de TRADD. As proteínas adaptadoras – TRAFs e TRADD subsequentemente após a interação com os domínios CTARs recrutam os complexos catalíticos multiproteicos contendo indutores da via do NFkB – quinase indutor de NFkB (NFkB Inducing Kinase –NIK e Ikb) e resulta na ativação da via canônica e não canônica de NFkB . Outras quinases são recrutadas por LMP1 por meio de TRAFs incluindo MAPKKKs que contribui para ativação da via do NFkB, MAPK, PI3K e ERK . Adaptado de Young and Rickinson 2004 (Young and Rickinson 2004).	25
FIGURA 6 Etapas da Carcinogênese. Adaptado de HLATKY & HAHNFELDT, 2014.(Hlatky and Hahnfeldt 2014)	29
FIGURA 7 Transição epitelial-mesenquimal. O processo de EMT envolve a transição funcional de células epiteliais polarizadas em células mesenquimais móveis e secretam componentes da matriz extracelular. Os marcadores utilizados para fenótipo epitelial e mesenquimal estão listados abaixo e a trocadeses marcadores definem a expressão do fenótipo mesenquimal. A detecção de células expressando ambos os marcadores é impossível para a detecção de todas as células mesenquimais que se originaram a partir de células epiteliais via EMT, e célula mesenquimais expressam todos os marcadores epiteliais antes da transição estar completa. Adaptado de (Kalluri and Weinberg 2009)	31
FIGURA 8 Mapa dos construtos gerados com o gene <i>BNLF1</i> do EBV, codificador da oncoproteína viral LMP1 (Müller-Coan 2016).	43
FIGURA 9 Células HEK293 não-transfectadas observadas em microscópio com contraste de fase (magnificação de 100x) (A), células transfectadas com vetor pZsGLMP1_B95.8 (B) e com pZsGLMP1_M81 (C), observadas em microscopia de fluorescência pela expressão da proteína verde fluorescente (GFP) (magnificação de 100x). Em (D), (E) e (F), células NP69 não-transfectadas, transfectadas com o vetor pZsGLMP1_B95.8e pZsGLMP1_M81, respectivamente (magnificação de 100X). As imagens A e D representam momentos distintos em relação ao registro das células transfectadas representados em B,C,E e F.	52
FIGURA 10 Análise dos produtos de PCR após eletroforese em gel de agarose efetuada para detecção de transcritos para a oncoproteína LMP1 dos isolados B95.8 e M81 do EBV, expressos em células HEK293 e NP69 transfectadas com o vetor-base e os vetores experimentais pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. Em todas as replicatas de células transfectadas com os construtos contendo a ORF do gene viral <i>BNLF1</i> observa-se o amplicon esperado de 212pb.....	52
FIGURA 11 Expressão de LMP1 em células HEK293 transfectadas transientemente com o vetor base pZsGreen e os vetores pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. β-Actina: controle endógeno.	53
FIGURA 12 Ensaio da luciferase expressa sob regulação de NF-κB induzido por EBV LMP1 para análise funcional dos vetores contendo as ORFs de LMP1'. Células HEK293 expressando as variantes de LMP1 B95.8 e	

M81 apresentam maior atividade de luciferase NF- κ B-responsiva em relação às células transfectadas com o vetor-base base (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$, ANOVA).....	53
FIGURA 13 Ensaio de viabilidade celular. Células HEK293 e NP69 transfectadas com o vetor-base controle pZsGreen, e os vetores experimentais pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. A viabilidade celular para células HEK293 transfectadas foi semelhante para as três condições apresentadas ($p \geq 0,05$; ANOVA). Para NP69, células expressando as variantes EBV LMP1 apresentaram menor viabilidade celular em relação ao controle, sendo significativo (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; ANOVA). Entre as variantes, células expressando LMP1 M81 apresentaram menor viabilidade em relação a células expressando LMP1 B95.8 (* $p \leq 0,05$; ANOVA).....	54
FIGURA 14 Ensaio de ativação de caspase . Células HEK293 e NP69 transfectadas com o vetor-base pZsGreen (controle), pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. Para ambas linhagens HEK293 e NP69 a ativação de caspase não foi significativa entre os grupos analisados ($p \geq 0,05$, ANOVA).....	54
FIGURA 15 Ensaio de migração celular <i>in vitro</i> . Número de células HEK293 e NP69 que migraram após 12 horas. Ambas linhagens transfectadas com os vetores pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81 apresentam número de células que migraram significativamente maior em relação ao grupo controle (* $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,001$ - GENMOD).	55
FIGURA 16 Ensaio de invasão celular. Células HEK293 e NP69 transfectadas com o vetor-base pZsGreen (controle), pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. As células expressando as variantes EBV-LMP1 B95.8 e M81 apresentaram maior capacidade de invasão em relação as células do grupo controle (* $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,001$, GENMOD). Entretanto, quando comparadas as variantes de LMP1 não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$ GENMOD).	55
FIGURA 17 Expressão diferencial das variantes gênicas de BNL1 que codifica LMP1. Ambas as linhagens de células HEK293 e NP69 (selecionadas por FACS) transfectadas com o vetor pZsGLMP1_M81 apresentaram maior expressão para o gene <i>BNL1</i> em relação ao grupo controle (células transfectadas com o vetor pZsGLMP1_B95.8 ($p \leq 0,001$; ANOVA).	56
FIGURA 18 Expressão diferencial dos transcritos de genes selecionados envolvidos na EMT avaliados em painel de qPCR para células HEK293 transfectadas com os vetores pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. A linha pontilhada representa o grupo controle (células transfectadas com o vetor-base) sendo significativo <i>Fold Change</i> $\geq 2,0$. Os dados de expressão dos genes de interesse foram obtidos após normalização feito pelas médias dos ciclos limiar (<i>Theshold Cycle</i> – Ct) dos genes de referência RPS18, RSP13 e HSP90AB1. Células expressando LMP1_B95.8 apresentaram alteração para MMP9 entretanto, não houve diferença significativa para os genes analisados entre as variantes ($p \leq 0,05$, Teste T Student).	57
FIGURA 19 Expressão diferencial dos transcritos de genes selecionados envolvidos na EMT avaliados em painel de qPCR. Experimentos efetuados a partir de RNA total de células NP69 transfectadas com os vetores pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81 selecionadas por FACS. A linha pontilhada representa o grupo controle (células transfectadas com o vetor-base) sendo significativo <i>Fold Change</i> $\geq 2,0$. Os dados de expressão dos genes de interesse foram obtidos após normalização feito pelas médias dos ciclos limiar (<i>Theshold Cycle</i> – Ct) dos genes de referência <i>RPS18</i> , <i>RSP13</i> e <i>HSP90AB1</i> . Células expressando as variantes de LMP1 apresentaram aumento na expressão de genes mesenquimais <i>CDH2</i> , <i>VIM FN1</i> , <i>MMP2</i> e <i>MMP9</i> em relação ao grupo controle. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas para os genes analisados entre as variantes de LMP1 ($p \leq 0,05$, Teste T Student).....	58

Lista de Quadros e Tabelas

QUADRO 1 Principais produtos virais expressos nos ciclos lítico e latente do EBV e suas funções desconhecidas (Kaye, Izumi, and Kieff 1993a; H.-P. Li and Chang 2003).	23
QUADRO 2 Genes virais expressos e associados com doenças em distintos programas durante a infecção latente do EBV (Elgui de Oliveira, Müller-Coan, and Pagano 2016)	23
QUADRO 3 Sequência nucleotídica das ORFs de EBV LMP1 variantes B95.8, M81 e suas respectivas sequências aminoacídicas. Em destaque são apresentados os sítios de restrição para as enzimas HindIII (A↓AGCTT) e BamHI (G↓GATCC), os quais foram utilizados no procedimento de clonagem direcional.....	42
QUADRO 4 Autenticação de linhagens de células. Todas as linhagens utilizadas foram analisadas comparando-se os perfis de STR obtidos com os apresentados em biorepositórios ou publicados na literatura.....	44
TABELA 1 Dados calculados para análise de eficiência de amplificação com os iniciadores utilizados nos experimentos de qPCR para avaliação da expressão de genes associados à EMT	50

Lista de Abreviaturas

AKT	Proteína quinase Serina/Treonina (<i>Serine/Threonine specific protein kinase</i>)
bHLH	Hélice-Alfa-Hélice Básico (<i>basic-helix-loop-helix – bHLH</i>)
cDNA	DNA complementar
CTAR	Região carboxi-terminal de ativação (<i>C-terminal Activation Region</i>)
CtBP	Proteína de ligação carboxi-terminal (<i>C-terminal Binding Protein</i>)
EBER	Pequenos RNA's Codificados pelo Vírus de Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr virus encoded small RNAs</i>)
EBNA	Antígeno Nuclear do Vírus de Epstein Barr (<i>Epstein-Barr Nuclear Antigen</i>)
EBV	Vírus de Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr Virus</i>)
EF1-α	Fator de Elongamento Humano alfa 1 (<i>Human Elongation Factor 1 Alpha</i>)
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EMT	Transição Epitelial-Mesenquimal (<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>)
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>)
FA	Adesão Focal (<i>Focal Adhesion</i>)
FAK	Quinase de Adesão Focal (<i>Focal Adhesion Kinase</i>)
GFP	Proteína Verde Fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos(<i>Human Leukocyte Antigens</i>)
IARC	Agência Internacional para Pesquisas em Câncer (<i>International Agency for Cancer Research</i>)
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral (<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>),
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IRES	Sequência Interna de Entrada Ribossomal do Vírus da Encefalomiocardite (<i>Encephalomyocarditis Virus Internal Ribosome Entry Site</i>),
LMP1	Proteína Latente de Membrana 1 (<i>Latent Membrane Protein 1</i>)do EBV
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos (<i>Mitogen Activated Proteins Kinases</i>)
MCS	Múltiplos Sítios de Clonagem (<i>Multiple Cloning Site</i>)
MET	Transição Mesenquimal-Epitelial (<i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>)
MMP	Metaloproteinase de matriz (<i>Matrix Metalloproteinase</i>)
NCBI	Centro Nacional para Informação Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>), Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA
NF-KB	Fator Nuclear Kappa B (<i>Nuclear Factor Kappa B</i>)
NPC	Carcinoma de nasofaringe (<i>Nasopharyngeal Carcinoma</i>)
ORF	Sequência Aberta para Leitura (<i>Open Read Frame</i>)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Quinase (<i>Phosphatidyl inositol 3-kinase</i>)
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa em Tempo Real(<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction in Real Time</i>)
RTK	Receptor Tirosina Quinase (<i>Receptor Tyrosin Kinase</i>)
FACS	Selecionador de Células Ativado por Fluorescência (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)
TGF-β	Fator de Crescimento Tumoral Beta (<i>Tumor Growth Factor Beta</i>)

TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>)
TRADD	Proteínas com domínio de morte associadas ao receptor de TNF (<i>TNF Receptor-associated Death Domain Proteins</i>)
TRAFs	Fatores Associados ao Receptor de Necrose Tumoral (<i>Receptor Factor Receptor Associated Factors</i>)
VEGF	Fator de Crescimentos Endotelial Vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
ZEB1	Fator de transcrição dedo de zinco Zeb1 (<i>Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1</i>)
ZO1	Zônula de Oclusão-1 (<i>Zonula Occludens-1</i>)

1 Resumo

Presente em aproximadamente 95% da população mundial o Vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus - EBV*) está relacionado com 1,5% dos casos de câncer no mundo com destaque para o carcinoma de nasofaringe (Nasopharyngeal Carcinoma – NPC) o qual segundo a Organização Mundial da Saúde, 90% dos carcinomas indiferenciados estão associados ao EBV. Expresso durante o ciclo de latência III e II a proteína latente de membrana 1 (*Latent Membrane Protein 1, LMP1*), um dos principais produtos oncogênicos do EBV mimetiza o receptor CD40 e mantém-se constitutivamente ativa na célula. Com papel importantíssimo no desenvolvimento do carcinoma de nasofaringe, LMP1 atua na imortalização e proliferação de linfócitos B por meio da deflagração de vias de sinalização intracelular como NFkB e PI3K/AKT. Atualmente são conhecidas sete variantes do gene *BNLF1* que codifica LMP1 e apresentam diferenças nas sequências nucleotídicas e aminoacídicas, ambas consideradas oncogênicas por conservarem os domínios CTARs. Essas diferenças encontradas nas variantes de LMP1 podem estar relacionadas à agressividade dos tumores. Entre as variantes de LMP1 foram avaliadas no presente estudo as variantes B95.8 e M81, ambas associadas ao desenvolvimento de NPC. As propriedades transformantes dessas variantes de LMP1 foram analisadas frente ao programa biológico transição epitelial-mesenquimal (*Epithelial-Mesenchymal Transition – EMT*) que está diretamente relacionado com a progressão dos carcinomas. A avaliação das variantes de LMP1 foi feito por meio de transfecção transiente de células HEK293 e NP69. Células expressando as variantes de LMP1 apresentaram maior capacidade de migração e invasão em relação ao grupo controle. Ainda, células expressando as variantes de LMP1 demonstraram alteração para alguns genes relacionados ao processo de EMT. No entanto, as variantes de LMP1 não apresentam diferenças significativas na regulação do programa de EMT.

Palavras-chave: Câncer, Vírus de Epstein-Barr, transição epitelial-mesenquimal, proteína LMP1.

Abstract

The Epstein-Barr virus (EBV) is present in approximately 95% of the world population. It is related to 1.5% of the cases of cancer in the world, especially Nasopharyngeal Carcinoma (NPC). According to the World Health Organization, 90% of undifferentiated carcinomas are associated with EBV. Expressed during latency cycle III and II Latent Membrane Protein 1 (LMP1), one of the main oncogenic products of EBV mimics the CD40 receptor and remains constitutively active in the cell. With important role in the development of nasopharyngeal carcinoma, LMP1 acts on the immortalization and proliferation of B lymphocytes through the development of intracellular signaling pathways such as NFkB and PI3K / AKT. Seven variants of the BNLF1 gene encoding LMP1 are currently known and show differences in the nucleotide and amino acid sequences, both considered oncogenic by conserving the CTAR domains. These differences found in the LMP1 variants may be related to the aggressiveness of the tumors. Among the variants of LMP1 were evaluated in the present study variants B95.8 and M81, both associated to the development of NPC. The transforming properties of these LMP1 variants were analyzed against the epithelial-mesenchymal transition (EMT) biological program that is directly related to the progression of carcinomas. Evaluation of the LMP1 variants was done by means of transient transfection of HEK293 and NP69 cells. Cells expressing the LMP1 variants presented greater migration and invasion capacity in relation to the control group. Furthermore, cells expressing the LMP1 variants have shown alteration for some genes related to the EMT process. However, the LMP1 variants do not present significant differences in the regulation of the EMT program.

Keywords: Cancer, Epstein-Barr virus, epithelial-mesenchymal transition, LMP1 protein.

2 Introdução

2.1 Infecção microbiana na etiopatogênese dos cânceres

Neoplasias são processos patológicos caracterizados pelo acúmulo de células com alterações genéticas e epigenéticas que comprometem fenômenos críticos da homeostasia tecidual, tais como diferenciação, proliferação e morte celular. Como resultado, essas doenças frequentemente se manifestam com formação de tumores neoplásicos, os quais podem ser classificados como benignos ou malignos (Hyndman 2016). As neoplasias malignas – denominadas “cânceres” – exibem células que invadem localmente e eventualmente podem se disseminar para outros sítios no organismo (Yamaguchi, Wyckoff, and Condeelis 2005). Ainda que os cânceres possam ser formados por tipos celulares equivalentes aos que formam um tecido saudável, suas células tipicamente se tornam mais heterogêneas ao longo da história natural da doença e apresentam comportamento biológico incompatível com a manutenção da integridade do tecido na qual se originam ou onde se instalam (Hanahan and Weinberg 2011).

Admite-se que os cânceres acometem seres humanos desde sua origem e a incidência dessas doenças tem aumentado globalmente (Hajdu 2011). Segundo informações do programa GLOBOCAN da Agência Internacional para Pesquisas em Câncer (*International Agency for Cancer Research* - IARC), que consolida dados para 28 tipos de câncer ocorrendo em 184 países, estima-se que em 2012 tenham ocorrido 14,1 milhões de novos casos dessas doenças no mundo, além de 8,2 milhões de mortes associadas a repercussões de neoplasias malignas. Os principais cânceres diagnosticados foram os que acometem pulmões (1,8 milhões), mama (1,7 milhões) e os cânceres coloriais (1,4 milhões), sendo que os cânceres de pulmão foram os principais responsáveis por óbitos (cerca de 1,6 milhões de pessoas). Até 2030, estima-se que cerca de 21,4 milhões de novos casos de cânceres e 13,2 milhões de mortes decorrente dessas doenças sejam registradas mundialmente (Ferlay et al. 2015). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima 600 mil novos casos de câncer para o biênio 2016/2017. Entre os tipos mais comuns de câncer no Brasil destacam-se os de mama, próstata, pulmão, intestino, colo de útero, pele, bexiga, estômago e cavidade oral (Instituto Nacional do Câncer - INCA 2015).

Ainda que em alguns casos o desenvolvimento de câncer esteja relacionado à predisposição genética, em indivíduos adultos as exposições a carcinógenos ambientais é

um dos componentes mais relevante da etiologia dessas doenças. Parcela das exposições a carcinógenos ambientais corresponde às infecções por microrganismos, algumas fortemente associadas a múltiplas doenças neoplásicas. Em geral, a infecção por microrganismos pode contribuir no desenvolvimento de neoplasias pela indução de inflamação crônica, estímulo à proliferação celular e interferência em mecanismos regulação de ciclo celular, apoptose, sinalização intra e intercelular (Francescone, Hou, and Grivennikov 2014).

A carcinogênese atrelada à infecção por microrganismos é favorecida em contextos socioeconômicos e sanitários mais precários e em decorrência do hábito sexual e reprodutivo, dentre outras condições (Bissell and Hines 2011). Quando comparado a países com elevado Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), países com baixo IDH apresentam altas taxas de cânceres associados a microrganismos, incluindo os de fígado, bexiga, colo do útero e o sarcoma de Kaposi, cujas incidências podem ser substancialmente reduzidas com medidas sanitárias, educativas, vacinação e ações de prevenção (Vineis and Wild 2014). Entre os microrganismos que podem causar câncer destacam-se helmintos como *Schistosoma haematobium*, associado ao câncer de bexiga, e o *Opisthorchis viverrini* associado ao câncer de fígado e ducto biliar (Fried, Reddy, and Mayer 2011); a bactéria *Helicobacter pylori*, associada ao adenocarcinoma gástrico (Polk and Peek 2010); o vírus do papiloma humano (*Human Papiloma Virus - HPV*), associado aos cânceres cervical e anogenital; e o vírus do sarcoma de Kaposi (*Human gammaherpesvirus 8 – HHV-8*), associado ao sarcoma de Kaposi e linfomas ocorrendo em pacientes imunocomprometidos (McLaughlin-Drubin and Munger 2008).

No início do século XX demonstrou-se que certos “agentes filtráveis” eram capazes de induzir cânceres em aves. Mais tarde esses agentes filtráveis foram reconhecidos como vírus, sendo que vários já foram implicados na etiopatogênese de neoplasias em diferentes espécies de animais. Estima-se que pelo menos 15% de todos os casos de cânceres humanos estejam relacionados a infecções virais. Os vírus potencialmente cancerígenos podem ter genomas constituídos por RNA ou DNA, mas comumente pertencem a umas poucas famílias principais: os flavivírus e retrovírus (ambos RNA), e os hepadnavírus, poliomavírus, papilomavírus, adenovírus e herpesvírus (estes últimos com DNA como patrimônio genético) (Liao 2006).

Digno de nota, a investigação sobre o papel da infecção por determinados vírus no desenvolvimento de neoplasias não apenas tem esclarecido relações etiológicas para doenças relevantes em medicina humana e veterinária, como também tem contribuído substancialmente para a elucidação da biologia desse importante grupo de doenças (McLaughlin-Drubin and Munger 2008). Saliente-se que alguns vírus têm se mostrado especialmente importantes em termos da carcinogenicidade para humanos. Esse é o caso do vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus* – EBV), primeiro vírus associado ao desenvolvimento de cânceres em humanos (Young, Yap, and Murray 2016).

2.2 Vírus de Epstein-Barr

2.2.1 Características gerais dos herpesvirus

O EBV é um herpesvírus, organismo que compõem a ordem *herpesvirale*, que é formada por três famílias: 1) *Herpesviridae*, com vírus que infectam mamíferos, aves e répteis; 2) *Alloherpesviridae*, com vírus que infectam peixes e anfíbios e 3) *Malacoherpesviridae*, com vírus que infectam moluscos. De acordo com suas propriedades biológicas, tropismo e similaridade genômica, a família *Herpesviridae* compreende 3 subfamílias (*Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirine* e *Gamaherpesvirinae*), 17 gêneros e 90 espécies de vírus que parasitam animais de diversas espécies, ocasionando doenças globalmente difundidas, tais como a catapora, a mononucleose infecciosa e o herpes genital em humanos (Davison et al. 2009). A classificação dos herpesvirus segue as normas definidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*International Committee on the Taxonomy of Viruses* – ICTV), a qual preconiza que os herpesvirus sejam designados por numeral arábico e indicação da família ou subfamília, e do hospedeiro natural, *e.g. Alfaherpesvírus humano* 1 (Davison 2010).

Os herpesvírus apresentam DNA dupla hélice linear e capsídeo icosaedro formado por 162 capsômeros. O envelope viral é composto por glicoproteínas virais, proteínas da célula infectada e componentes lipídicos oriundos da membrana nuclear e plasmática. Entre o capsômero e o envelope viral encontra-se o tegumento, estrutura composta essencialmente de proteínas e atuam nos primeiros estágios da replicação viral inibição de síntese proteica de célula hospedeira e transativação de genes virais (Feederle et al. 2006; Kelly et al. 2009). Além da estrutura genômica, os herpesvírus também compartilham o mecanismo de entrada nas células (mediado por glicoproteínas do envelope viral que

interagem com receptores de superfície das células do hospedeiros) e o estado de latência, situação do ciclo biológico onde o genoma viral se encontra em forma epissomal no núcleo da células hospedeira e mantém ativo a expressão de grupo restrito de genes (Lieberman 2013; Connolly et al. 2011).

Apesar de ser um grupo numeroso, apenas oito espécies de herpesvírus parasitam naturalmente células humanas: o herpesvírus simples 1 (*Human alphaherpesvirus 1 – HHV1*); herpesvírus simples 2 (*Human alphaherpesvirus 2 – HHV2*), o vírus varicela zoster (*Human alphaherpesvirus 3 – HHV3*), o vírus de Epstein-Barr (*Human gammaherpesvirus 4 – HHV4*), o citomegalovírus (*Human Betaherpevirus 5 – HHV5*); os herpesvírus 6 (*Human betaherpesvirus 6 – HHV6*) e 7 (*Human betaherpesvirus 7 – HHV7*), e o herpesvírus do sarcoma de Kaposi (*Human gammaherpesvirus 8 – HHV8*) (Davison et al. 2009). Dentre esses, destaca-se o vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus - EBV*), cuja infecção se associa a cerca de 1,5% dos casos de cânceres em humanos (Young, Yap, and Murray 2016).

O EBV foi originalmente descrito em 1964, identificado em células derivadas de linfoma de Burkitt (Figura 1), câncer de elevada incidência em crianças africanas residentes no cinturão da malária (Epstein et al. 1965). A infecção por esse vírus é classificada como comprovadamente cancerígena para humanos, de modo que o vírus foi alocado no grupo I da IARC (IARC 1997).

Embora mais de 90% da população mundial apresente infecção latente pelo EBV, à carga viral nos indivíduos infectados tipicamente é baixa sendo a infecção assintomática ou subclínica. Igualmente, o desenvolvimento de cânceres associados à infecção pelo EBV costuma ser evento esporádico (Young, Yap, and Murray 2016).

O EBV pode ser transmitido pela saliva, transfusão sanguínea e transplante de órgãos; aparentemente não existe um grupo populacional particularmente suscetível infecção viral (M. P. Thompson and Kurzrock 2004). O EBV infecta células epiteliais da orofaringe e ativa replicação lítica produzindo novas partículas virais infecciosas. Essas novas partículas virais migram para o tecido linfóide do anel de Weldeyer, onde infectam linfócitos B (Figura 2). Subsequentemente o vírus pode entrar em ciclo latente, sendo que seu genoma assume a forma epissomal e há expressão de número limitado de genes, essencialmente os envolvidos necessários para manutenção e replicação do epissoma viral (Rickinson 2014; Young and Rickinson 2004).

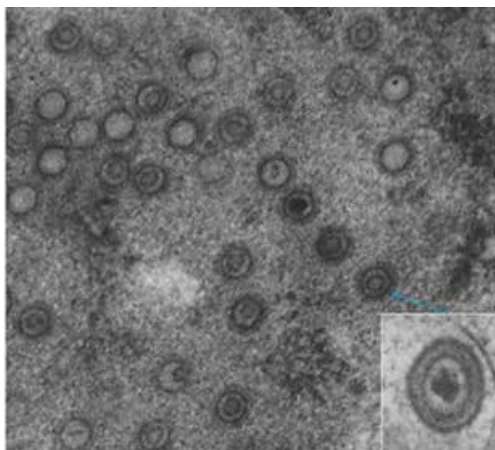


FIGURA 1 Microscopia eletrônica de células derivadas do linfoma de Burkitt. Em destaque, a partícula do vírus de Epstein-Bar observada pela primeira vez (Epstein et al. 1965)

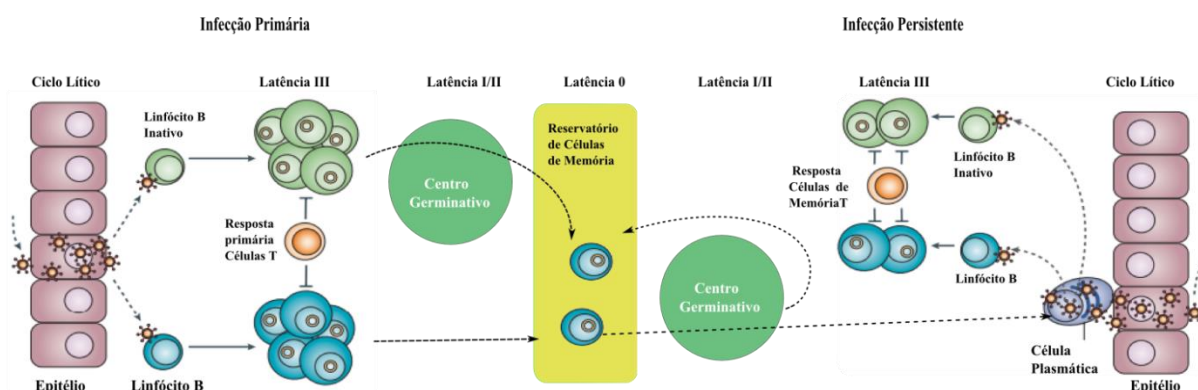


FIGURA 2 –Infecção pelo EBV em humanos. **Infecção Primária:** O vírus infecta células da orofaringe, nas quais estabelece ciclo lítico (produtivo). As partículas virais difundem-se para o tecido linfóide adjacente e infectam linfócitos B, nas quais estabelecem infecção latente. Muitos linfócitos B infectados são identificados e eliminados pela resposta imunitária, mas alguns linfócitos infectados escapam e se estabelecem como repertório de células EBV-positivas com supressão de expressão de antígenos virais. **Infecção persistente:** Ocasionalmente, linfócitos B infectados podem ser requeridos em resposta imunitárias, o que deflagra diferentes programas de latência. Essas células podem retornar para o centro germinativo ou se diferenciar em plasmócitos, que se deslocam para regiões de mucosa da orofaringe, onde ocorre reativação do ciclo lítico. As novas partículas virais formadas podem infectar células epiteliais da orofaringe, ou linfócitos B, contribuindo para a manutenção da infecção persistente. No entanto, é provável que a maioria dessas células sejam removidas pela ação de linfócitos T. Adaptado de Young e Rickinson (Young and Rickinson 2004)

A primeira exposição ao EBV comumente ocorre durante a infância, na fase de lactação. A infecção primária é suspeitada nos quadros de mononucleose infecciosa (“Doença do Beijo”), nos quais febre e mal estar geralmente são queixas frequentes (Balfour, Dunmire, and Hogquist 2015). Em termos de doenças neoplásicas, a infecção pelo EBV está

consistentemente relacionada ao desenvolvimento do linfoma de Burkitt endêmico africano e do carcinoma de nasofaringe (*Nasopharyngeal Carcinoma – NPC*), além da parcela variável dos casos de linfomas Hodgkin e não-Hodgkin e de carcinomas gástricos (Young, Yap, and Murray 2016).

A infecção de linfócitos B é o mecanismo pelo qual se estabelece a infecção latente no hospedeiro, que pode persistir por toda a vida com níveis baixos de produção de partículas virais, favorecendo escape da resposta imunitária (M. P. Thompson and Kurzrock 2004). A entrada viral nos linfócitos B ocorre por endocitose, após interação da glicoproteína viral gp350/220 (isoformas) com a molécula CD21 (receptor para a fração 2 do complemento - CR2), seguido de fusão de envelope viral mediada pela proteína viral gp42, que interage com o moléculas de classe 2 do complexo de antígenos leucocitários humanos (*Human Leukocyte Antigen – HLA*). A entrada do EBV em células epiteliais ainda não está suficientemente esclarecida, mas demanda fusão direta do envelope viral com a membrana plasmática, o que é mediado pelas glicoproteínas virais BMRF2, gp85 (gH) e gp25 (gL). Essas moléculas interagem com integrinas $\beta 1$ e $\alpha 5$ presentes na membrana das células epiteliais humanas (Shannon-Lowe and Rowe 2011; Lindsey M. Hutt-Fletcher 2007). Entre 16 e 20h após a entrada nas célula, o genoma viral linear adquire circularização, originando um epissoma; nesse ínterim, ocorre a expressão dos primeiros genes de latência: o antígeno nuclear de latência 2 do EBV (*Epstein-Barr Nuclear Antigen 2 - EBNA2*) e o antígeno nuclear LP do EBV (*Epstein-Barr Nuclear Antigen Leader Protein–EBNA-LP*) (Bornkamm and Hammerschmidt 2001).

As partículas virais produzidas no hospedeiro apresentam mudança de tropismo. Sabe-se que vírions produzidos em linfócitos B apresentam menor expressão de gp42. Adicionalmente, o complexo proteico formado pelas proteínas do envelope viral gHgLgp42 pode interagir com o sistema imaturo de HLA2 no retículo endoplasmático e ser degradado (Lindsey M. Hutt-Fletcher 2007; Shannon-Lowe and Rowe 2011). Como resultado, as partículas virais produzidas nos linfócitos B apresentam maior tropismo por células epiteliais devido à baixa expressão de HLA classe II e CR2/C21. Entretanto, vírions produzidos em células epiteliais apresentam maior expressão de gp42, ocasionando maior tropismo para linfócitos B (Ni et al. 2015; Lindsey M. Hutt-Fletcher 2007).

O DNA linear do EBV é composto por dupla hélice com cerca de 184 kb, que codificam mais de 90 genes. Originalmente, o genoma viral foi mapeado com auxílio da enzima *Bam*HI, originando fragmentos de restrição nomeados de A a Z de acordo com seu tamanho (Münz 2015b). A Figura 3 ilustra a estrutura do genoma do EBV em forma epissomal. Dois genótipos virais são descritos atualmente, EBV-1 e EBV-2, sendo a diferença presente no genoma ainda não muito bem estabelecido (Palser et al. 2015).

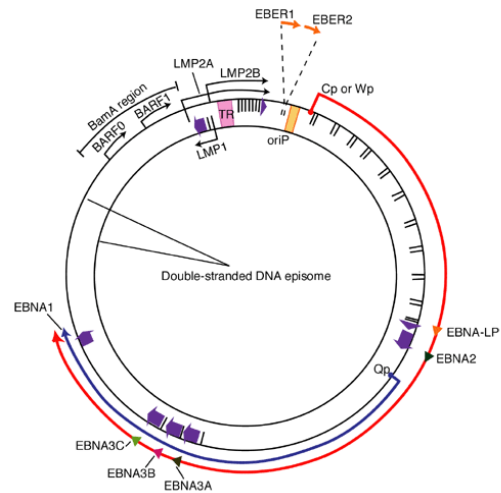


FIGURA 3 Diagrama do epissoma do EBV com a localização e sentido de transcrição de genes virais do ciclo latente (Murray and Young 2001).

As diferenças genômicas entre EBV-1 e EBV-2 estão ligadas principalmente ao gene que codifica o antígeno nuclear 2 do EBV (*Epstein-Barr Nuclear Antigen - EBNA2*), com identidade de sequência de 56%. Adicionalmente, foram encontradas variações nos genes para os antígenos nucleares 3A, 3B e 3C do EBV (EBNA3A, EBNA3B e EBNA3C) (Palser et al. 2015). EBV-1 é mais frequente na população caucasiana e asiática, sendo encontrado em 80% dessas populações. Por outro lado, foi relatado um aumento de infecção por EBV-2 na África, associado a casos de linfoma de Burkitt. A co-infecção pelos dois tipos virais não é habitual, ocorrendo principalmente em indivíduos imunossuprimidos (Yao et al. 1996).

De modo geral, admite-se que o EBV-1 é mais eficiente que o EBV-2 na transformação de linfócitos B (Rickinson, Young, and Rowe 1987). Ademais, EBV-1 apresenta variantes que podem ser distinguidas por polimorfismos encontrados em alguns de seus genes (Görzner et al. 2006). No presente trabalho, duas variantes de EBV-1 são investigadas: B95.8, isolada de paciente americano com mononucleose infecciosa (primeira variante viral completamente sequenciada), e M81, isolada de um paciente chinês com carcinoma de nasofaringe (Baer et al. 1984; Desgranges et al. 1976).

O isolado B95.8 do EBV exibe maior capacidade transformadora de linfócitos B em células linfoblastóides, enquanto M81 é mais epiteliotrópica e apresenta elevada taxa de ativação lítica espontânea (Tsai Ming-Han et al. 2013). Saliente-se que essas variantes virais apresentam diferenças para o gene *BZLF1*, que participa na reativação do lítico, o que

presumivelmente pode contribuir na patogênese de doenças associadas ao EBV (Tsai Ming-Han et al. 2013; Mainou and Raab-Traub 2006). Adicionalmente, é importante notar que a replicação lítica viral também contribui no desenvolvimento de cânceres relacionados à infecção pelo EBV (Shumilov et al. 2017).

Assim como acontece com os demais herpesvírus, o ciclo biológico do EBV tem duas etapas, denominadas ciclos lítico e latente (Young and Rickinson 2004). Durante o ciclo lítico viral ocorre a expressão da maioria dos genes virais e o genoma do EBV é replicado mais de mil vezes, originando partículas virais responsáveis pela infecção de novas células e outros hospedeiros suscetíveis (Quadro 1) (Brocqueville et al. 2013). O ciclo lítico é deflagrado com a expressão dos genes *BZLF1* e *BRLF1*, os quais se ligam à região de origem de replicação lítica *OriLyt*, induzindo a ativação de mais de cinquenta genes responsáveis pela expressão de enzimas, transcrição de RNA e replicação do genoma viral (Reusch et al. 2015).

O ciclo latente é deflagrado logo após a infecção celular e poucos genes são expressos, de modo a propiciar a manutenção do DNA viral na forma de epissoma nuclear (Quadro 1) (Young and Rickinson 2004a; D. Wang, Liebowitz, and Kieff 1985). Nessa fase, a replicação do genoma viral requer ligação de EBNA1 com a região mínima de replicação plasmidial *OriP*, sendo sincronizada com a replicação do genoma da célula hospedeira; tipicamente apenas uma cópia do epissoma viral é gerada (Kang and Kieff 2015).

A expressão de genes virais durante a latência caracteristicamente é limitada aos genes requeridos para a infecção persistente. As proteínas virais expressas estimulam a proliferação celular, inibem apoptose e asseguram distribuição do genoma viral entre as células-filhas durante a mitose, além de retardarem a ocorrência do ciclo lítico até momento oportuno (Yates, Camiolo, and Bashaw 2000; I. G. Miller and El-Guindy 2002). São descritos 3 programas principais de expressão gênica no ciclo latente do EBV, denominados latências tipo I, II e III (**Quadro 2**).

A maioria das células malignas em cânceres associados ao EBV apresentam infecção latente, mas tanto o ciclo lítico quanto os programas de latência desempenham papéis relevantes na patogênese dessas doenças. Por exemplo, enquanto os produtos expressos por genes do ciclo lítico podem induzir instabilidade genômica em células infectadas, os de ciclo latente propiciam estímulos para sobrevivência das células geneticamente modificadas (Young and Rickinson 2004). Por outro lado, produtos virais com potencial cancerígeno são

QUADRO 1 Principais produtos virais expressos nos ciclos lítico e latente do EBV e suas funções conhecidas (Kaye, Izumi, and Kieff 1993a; H.-P. Li and Chang 2003).

Produtos Ciclo Lítico	Funções	Produtos Ciclo Latente	Funções
BZLF1 / BRLF1	Ativa expressão dos genes envolvidos no ciclo lítico	EBNA1	Liga o episoma viral ao genoma do hospedeiro e inibição de apoptose em linfoma de Burkitt.
BHRF1	Homólogo BCL, previne apoptose, não essencial para replicação viral	EBNA2	Transativador de genes virais (LMP1) e celulares (c-MYC, CD23); essencial para transformação celular e interage com fatores de transcrição.
BCRF1	Homólogo IL-10; pode regular negativamente o sistema imune	EBNA3C	Promove a expressão de LMP1 e media a transformação de linfócitos B.
BALF5	Fator de replicação; DNA polimerase	EBNA-LP	Proliferação de linfócitos B aumenta habilidade de EBNA2 para expressar LMP1.
BALF2	Fator de replicação; proteína DNA ligante fita simples	LMP1	Mimetiza receptor CD40; inativa NFkB para promover sobrevivência celular; promove a transformação de linfoma B.
BMRF1	Fator de replicação e processabilidade	LMP2A	Previne a entrada do ciclo lítico; promove sobrevivência de linfócitos B.
BSLF1 e BBLF4	Fator de replicação; complexo primase helicase	EBERs 1 / 2	Sobrevivência celular; induz expressão de IL-10; persistência viral e aumenta tumorigenicidade.
BBLF2/3	Fator de replicação; componente do complexo splicing primase helicase		
BKRF3	Fator de replicação; DNA uracil glicocilase		
BLLF1 gp350/220	Medeia adsorção de EBV e CD21		

QUADRO 2 Genes virais expressos e associados com doenças em distintos programas durante a infecção latente do EBV (Elgui de Oliveira, Müller-Coan, and Pagano 2016)

Latência	Genes expressos*	Contexto da Infecção por EBV
Tipo I (“EBNA somente”)	EBERs, BARF0, EBNA1, (LMP2A)	Proliferação de linfócitos B células de BL <i>in vivo</i> ; carcinoma gástrico associado ao EBV.
Tipo II (“Programa Padrão”)	EBERs, BARFs, EBERs, EBNA1, LMPs 1 e 2A	Células B do centro germinativo; células neoplásicas de NPC e cLH
Tipo III (“Programa de crescimento”)	EBERs, BARFs, EBNA1 (1, 2, 3A, 3B, 3C e LP), LMPs (1, 2 e 2B)	Células B e linfoblastóides; doença linfoproliferativa em imunossuprimidos (PTLD) e imunoblastos (NLH).

* Em todos os programas há expressão de um conjunto variado de microRNAs. Em alguns casos de EBV associado ao carcinoma gástrico também é identificado a expressão de LMP2A. EBER: small RNAs (EBERs 1 e 2), BARF: transcritos para a região BamHI A (BARF0 e/ou BARF1); EBNA: EBV antígeno nuclear; LMP: proteína latente de membrana (*Latent Membrane Protein*); Linfoma de Burkitt (*Burkitt Lymphoma – BL*); cLH - Linfoma de Hodgkin clássico (*Classical Hodgkin Lymphoma – cHL*); Linfoma não-Hodgkin (*Non-Hodgkin Lymphoma – NHL*); Carcinoma de Nasofaringe (*Nasopharyngeal Carcinoma NPC*); Doença Linfoproliferativa Pós Transplante (*Post-transplant lymphoproliferative disorders – PTLD*).

melhor documentados dentre os expressos durante o ciclo latente, com destaque para a oncoproteína viral LMP1.

2.3 Oncoproteína LMP1 do EBV

LMP1 é uma proteína transmembrana do EBV com propriedades transformantes para linfócitos B e requerida para o estabelecimento de latência (Lam and Sugden 2003; H.-P. Li and Chang 2003). É codificada pelo gene viral *BNLF1*, geralmente expresso nos programas tipo II e III da latência (Quadro 2). Possui 63 KDa (386 aminoácidos) e é estruturalmente dividida em uma região aminoterminal curta (24 aminoácidos), 6 domínios hidrofóbicos transmembranosos e uma região citoplasmática carboxiterminal (200 aminoácidos), composta de três domínios de ativação (*C-Terminal Ativation Region* – CTAR) denominados CTAR1, CTAR2 e CTAR3 (Figura 3)(H.-P. Li and Chang 2003).

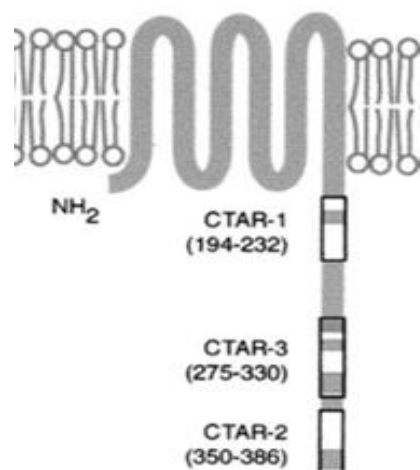


FIGURA 4 Estrutura da proteína LMP1 doEBV. (Fielding et al. 2001)

A porção aminoterminal de LMP1 é responsável pela ancoragem e orientação da proteína na membrana plasmática da célula infectada, enquanto os domínios hidrofóbicos respondem pela reorganização do citoesqueleto e alteram a morfologia celular via ativação da enzima GTPase Cdc42 (H.-P. Li and Chang 2003). Os domínios CTARs (Figura 5), por sua vez, deflagram ativação de vias intercelulares de sinalização, notadamente NF- κ B, JNK, MAP-quinases, e PI3K, sendo dependentes da sinalização do fator associado ao receptor de necrose tumoral 6 (*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6* - TRAF6) e de proteínas com domínio de morte associadas ao receptor de TNF (*TNF Receptor-associated Death Domain Proteins* - TRADD) decorrente da falta de atividade quinase de LMP1 (Eliopoulos and Young 2001).

EBV LMP1 é estruturalmente homóloga ao receptor CD40, uma glicoproteína transmembrana com importante papel no sistema imunológico e que tem isoformas expressas em linfócitos B, monócitos, células epiteliais, eosinófilos e outras (Lam and Sugden 2003). A interação de CD40 com seu ligante (CD40L) atua na ativação, manutenção da sobrevivência e proliferação de linfócitos B, imunidade, ativação de vias de sinalização como NF κ B e ERK, formação de centro germinativo (Rastelli et al. 2008). LMP1 atua de maneira

similar a CD40; entretanto, encontra-se constitutivamente ativa, independe de ligante para ativação e apresenta efeito citotóxico quando expressada em altos níveis (Lam and Sugden 2003; Lee and Sugden 2008).

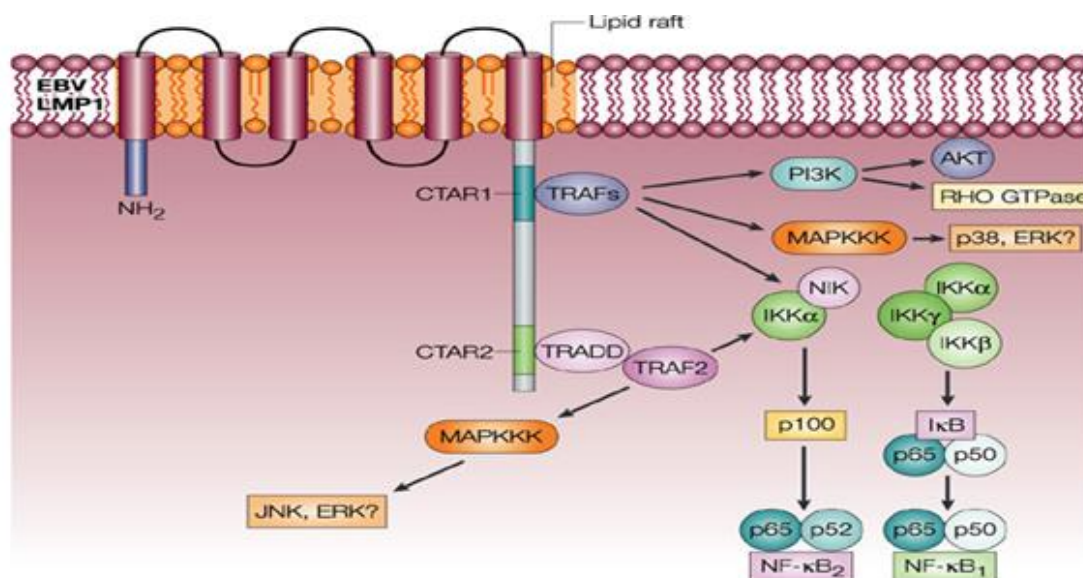


FIGURA 5 Região Carboxi-Terminal. A sinalização de LMP1 resulta da habilidade dos domínios CTAR1 interagir diretamente com TRAFs ou de CTAR2 que interage indiretamente com TRAFs por meio da ativação de TRADD. As proteínas adaptadoras – TRAFs e TRADD subsequentemente após a interação com os domínios CTARs recrutam os complexos catalíticos multiproteicos contendo indutores da via do NFκB – quinase indutor de NFκB (NFκB Inducing Kinase –NIK e IκB) e resulta na ativação da via canônica e não canônica de NFκB . Outras quinases são recrutadas por LMP1 por meio de TRAFs incluindo MAPKKKs que contribui para ativação da via do NFκB, MAPK, PI3K e ERK . Adaptado de Young and Rickinson 2004 (Young and Rickinson 2004).

LMP1 contribui para a manutenção do ciclo latente, estabelecimento e progressão de doenças associadas à infecção pelo EBV (Eliopoulos and Young 2001). O potencial carcinogênico da LMP1 é atribuído a efeitos como indução de replicação do DNA em linfócitos B e expressão de proteínas anti-apoptóticas, como *bcl-2*, *mcl-1* e *bfl-1* (Mimi and Yuan 2002; Wei and Sham 2005). Mais recentemente, alguns estudos têm demonstrado que LMP1 pode contribuir na agressividade biológica de cânceres associados ao EBV, efeitos relacionados à ação dessa oncoproteína viral em fenômenos característicos da etapa de progressão da carcinogênese, tais como motilidade celular, invasão e disseminação de células neoplásicas no organismo (Elgui de Oliveira, Müller-Coan, and Pagano 2016; Horikawa et al. 2011).

Considerado o principal produto oncogênico do EBV, LMP1 atua na patogênese de diversos cânceres associados à infecção pelo EBV. No carcinoma de nasofaringe a expressão

gênica para *BNLF1* (LMP1) é identificado em 90% dos casos e, em 60% dos casos LMP1 é identificada por imunohistoquímica (L. Ma et al. 2014).

A análise filogenética do gene *BNLF1* para 83 variantes de EBV (tipo 1 e 2) demonstrou a existência de 7 variantes gênicas e sugere-se que essas variantes codificadas para LMP1 possam apresentar distintas propriedades transformantes (Palser et al. 2015). Nomeadas B95. 8, China 1, China 2, China 3, Alaska, Med e NC, essas variantes podem ser distinguidas pela deleção de 30pb na região carboxi-terminal, 10pb deleção na região amino-terminal e pela sequência aminoacídica, tendo como protótipo o genótipo da variante B95.8 (W. E. Miller et al. 1994; C. M. Chang et al. 2009). Por outro lado, as variantes de LMP1 preservam algumas características, tais como o códon 335 (associado o *turnover* de LMP1), e as regiões CTAR1 e CTAR2, propriedades que sugerem que essas variantes compartilham a capacidade transformante para linfócitos B (Tsao et al. 2002; Raab-Traub 2012).

Cânceres associados ao EBV ocorrem com maior frequência em algumas regiões geográficas e estão relacionados a fatores ambientais e a genética populacional. Além disso, as formas endêmicas de cânceres associados ao EBV podem estar diretamente relacionadas às propriedades biológicas de determinadas variantes virais (Dheekollu et al. 2017). No entanto, ainda não está esclarecido se variantes de LMP1 apresentam comportamento diferente no desenvolvimento de doenças associadas ao EBV (Tsao et al. 2002). Algumas evidências indicam que diferenças entre as variantes de LMP1 apresentam importante papel no desenvolvimento de cânceres: por exemplo, quando comparadas ao protótipo LMP1 B95.8, as variantes de Cao e C15 apresentam menor resposta imunogênica e maior potencial oncogênico (Dawson, Port, and Young 2012; Burrows et al. 2004).

Pelo exposto, nota-se que eventuais alterações nas propriedades biológicas de produtos do EBV podem ter impacto na patogênese de doenças associadas à infecção viral, notadamente cânceres com estreita relação com o EBV, como o carcinoma de nasofaringe, que será abordado a seguir.

2.4 Carcinoma de nasofaringe

Distinto tipo de câncer de cabeça e pescoço, o NPC desenvolve-se no epitélio da nasofaringe principalmente na fossa de Rosenmuller e tuba de Eustáquio (L. D. R. Thompson 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization – WHO*) o NPC pode ser agrupado em três subtipos de acordo com as características histológicas em

carcinoma de células escamosas queratinizadas – tipo I e carcinoma de células escamosas não queratinizadas – tipo II e III os quais abrangem 95% dos casos e predominantemente são causados pelo EBV (Houldcroft and Kellam 2015).

Com baixa incidência mundial $< 1: 100.000$, anualmente são constatados cerca de 80.000 novos casos e 50.000 mortes (Hildesheim and Wang 2012; Wei and Sham 2005). Regiões endêmicas como o sul da China (província de Guangdong) apresenta os maiores índices: 20 – 30 : 100.000 anualmente (Ward et al. 2000). Em geral, homens são mais afetados do que as mulheres – 3:1, sendo a maior taxa de incidência registrada na faixa etária de 50 - 59 anos com declínio nos anos subsequentes (E. T. Chang and Adami 2006).

A associação do EBV ao carcinoma de nasofaringe foi inicialmente descoberto mediante estudos sorológicos os quais demonstraram a associação de EBV_DNA e antígenos nucleares (EBNA) em células tumorais de NPC (Razak et al. 2010). Entretanto, sabe-se que o EBV sozinho é insuficiente para induzir o desenvolvimento tumoral, característica que denota a necessidade de cofatores como susceptibilidade genética, condições ambientais atrelados ao consumo de nitrosaminas utilizada na salga de peixes, exposição a pó-de-madeira, ervas medicinais, consumo de álcool e cigarros (Hildesheim and Wang 2012; Ward et al. 2000).

As principais causas da variação geográfica de NPC estão associados à alimentação e ao polimorfismo genético (M. C. Yu and Yuan 2002). A alimentação a base de peixes conservados com sal apresentam nitrosaminas voláteis e a utilização de algumas plantas medicinais, estão relacionadas à ativação do EBV (E. T. Chang and Adami 2006). Indivíduos que apresentam *locus* polimórfico para o sistema antígeno leucocitário humano 2 (*Human Antigenic Leucocyte – HLA2*) nos alelos HLA – A2, B14, 17 e B46 possuem capacidade reduzida para apresentar EBV-antígeno (E. T. Chang and Adami 2006; X. Li et al. 2009). Caracteristicamente é observado nas regiões de maior incidência de NPC a perda de heterozigose do cromossomo 3p e pode estar relacionado com a suscetibilidade populacional em desenvolver NPC (A. S. C. Chan et al. 2000).

Corroborando para o entendimento da variação geográfica, pesquisas comparando a incidência de NPC em diferentes regiões constataram que imigrantes chineses que vivem na América do Norte apresentam elevada frequência de NPC. Entretanto, a incidência diminui quando avaliados os descendentes de chineses nascidos nessa região. Esse fato demonstra

que o processo neoplásico provavelmente teve início quando esses imigrantes ainda habitavam a região de origem (E. T. Chang and Adami 2006).

A maioria dos casos de NPC, entre 75% a 90% são diagnosticados em estágio avançado – III e IV. Isso acontece devido a localização da nasofaringe que torna dificultoso a realização de exames clínicos (Wei and Sham 2005). Altamente quimiorresponsivo e radorresponsivo, o NPC quando descoberto em estágio inicial apresenta uma taxa de cura de 80% e sobrevida de 5 anos, sendo recorrente em 5% dos indivíduos. Entretanto, apresenta elevada taxa de metástase – 50% dos indivíduos, fato atribuído a vascularização linfática da nasofaringe que permite rápida difusão das células cancerígenas e formação de novos sítios metastáticos, principalmente nos ossos, pulmão e fígado (K. H. Yu et al. 2005; L. D. R. Thompson 2007).

A presença de LMP1 em biópsias de carcinoma de nasofaringe é um indicativo de sua participação no processo de tumorigenese. A identificação de LMP1 por imunodeteção é baixa, contrário ao observado quando analisado a expressão do gene *BNLF1*. Segundo Tsao e colaboradores essa diferença de expressão é favorável ao desenvolvimento de tumores, uma vez que o nível estável e baixo de LMP1 é suficiente para induzir mudanças morfológicas e fenótipo invasivo. Por outro lado, altos níveis de expressão de LMP1 resultam em efeitos citopáticos para linhagens de NPC (Tsao et al. 2002).

2.5 Progressão dos cânceres

Os cânceres são doenças complexas que demandam tempo variável (décadas, usualmente) para se desenvolver desde o surgimento da primeira célula alterada até a formação do tecido neoplásico maligno. Durante esse desenvolvimento tipicamente as células envolvidas na carcinogênese acumulam mutações, que serão transmitidas para as células descendentes. A carcinogênese é tradicionalmente dividida em três etapas sequenciais, denominadas iniciação, promoção e progressão, conforme ilustrado na Figura 6 (Tomlinson, Sasieni, and Bodmer 2002).

A iniciação, primeiro estágio da carcinogênese, decorre de alterações genômicas irreversíveis provocadas por agentes carcinogênicos (e.g., fatores ambientais, incluindo microrganismos) ou que surgem espontaneamente. O acúmulo dessas alterações pode ocasionar instabilidade genética e modificar o fenótipo celular, predispondo as células alteradas à transformação maligna (Hlatky and Hahnfeldt 2014). A célula inicializada pode

permanecer quiescente sem causar danos ou sofrer expansão clonal pela ação de agentes promotores ou eventos regenerativos, comumente associados à inflamação crônica. Uma vez que ocorre a transformação celular, em condições favoráveis as células malignas passam a colonizar seu sítio de origem, o que define a última fase da carcinogênese: a progressão tumoral. Nesse estágio as células transformadas se acumulam e causam alterações teciduais e eventualmente sistêmicas que tornam evidente a doença (i.e., manifestação do câncer). pelo organismo e ocasionalmente gerar metástases (Henry Pitot 1989; Yokota 1999).

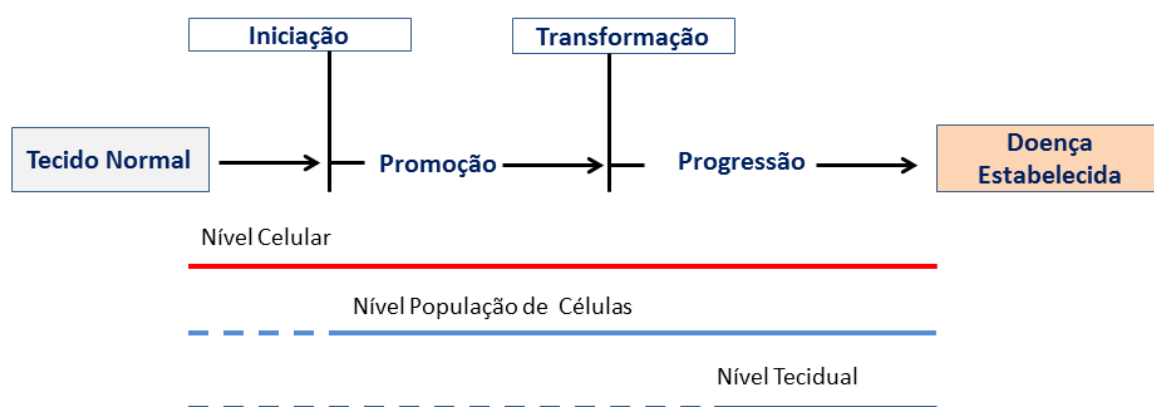


FIGURA 6 Etapas da Carcinogênese. Adaptado de HLATKY & HAHNFELDT, 2014.(Hlatky and Hahnfeldt 2014)

É durante a progressão que as células neoplásicas podem adquirir capacidade de disseminação. Dois importantes fenômenos envolvidos na progressão tumoral merecem destaque: angiogênese e metástase. Com o crescimento do tumor, as condições do microambiente tecidual se tornam deficientes em termos de fornecimento de oxigênio e nutrientes para as células transformadas em franca proliferação. O microambiente hipóxico enseja a angiogênese, caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de microvasculatura pré-existentes. A angiogênese é estimulada por diferentes mediadores químicos, notadamente os fatores de crescimento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF) e algumas citocinas como SDF1, G-CSF, IL6, PlGF (Dimova, Popivanov, and Djonov 2014; Moserle and Casanovas 2013).

A metástase é um processo complexo que envolve a disseminação de células neoplásicas para órgãos distantes e adaptação ao novo ambiente. Aproximadamente menos

0,1% das células que infiltram no sistema circulatório desenvolverão sítios metastático sem outros órgãos devido às condições que enfrentarão no novo ambiente (Hunter 2004; van Zijl, Krupitza, and Mikulits 2011). Caracterizado pelo desligamento de células malignas do tumor primário e disseminação para outros sítios por meio da circulação sanguínea e/ou linfática, o processo metastático é pormenorizado pelos seguintes acontecimentos que conduzirá a célula tumoral a outro órgão: I – Infiltração local de células tumorais em tecidos adjacentes; II – migração transendotelial; III – sobrevivência no sistema circulatório; IV – extravasamento e V – proliferação subsequente em órgãos competentes (van Zijl, Krupitza, and Mikulits 2011; Eger and Mikulits 2005).

No caso de neoplasias de histogênese epitelial, o potencial de disseminação neoplásica se correlaciona com a ocorrência do fenômeno de transição epitelial-mesênquimal (*Epithelial-Mesenchymal Transition* - EMT), que tipicamente propicia maior motilidade e sobrevivência da célula.

2.6 Transição Epitelial-Mesênquimal

A ativação do programa de EMT em células tumorais é considerado um dos mecanismos críticos para a aquisição do fenótipo maligno. Definido como o processo biológico que permite as células epiteliais assumir o fenótipo mesênquimal é caracterizado pela perda de junções intercelulares, reorganização do citoesqueleto, mudanças metabólicas, aquisição de habilidade invasiva e migratória, subversão da senescência celular e apoptose (Thiery 2002).

Durante a EMT, as células epiteliais regulam negativamente suas propriedades adquirindo características de células mesênquimais. As células epiteliais perdem adesão e ganham motilidade devido à supressão das junções celulares e da polaridade baso-apical. Células em EMT caracteristicamente apresentam expressão diminuída das proteínas claudina e ocludina (componentes da zônula ocludente), além de caderina-E, culminando com ativação da sinalização proporcionada por β -catenina, que aumenta o potencial migratório e invasor da célula (Figura 7) (Lamouille, Xu, and Derynck 2014).

Identificado durante o desenvolvimento embrionário, o processo de EMT permite as células transitarem entre o fenótipo epitelial e mesênquimal. Posteriormente, foi constatado

que esse processo pode ser reativado para originar tecidos adultos a partir da conversão de células epiteliais em mesenquimais e reativado em algumas doenças como o câncer (Nieto et al. 2016).



FIGURA 7 Transição epitelial-mesenquimal. O processo de EMT envolve a transição funcional de células epiteliais polarizadas em células mesenquimais móveis e secretam componentes da matriz extracelular. Os marcadores utilizados para fenótipo epitelial e mesenquimal estão listados abaixo e a troca desses marcadores define a expressão do fenótipo mesenquimal. A detecção de células expressando ambos os marcadores é impossível para a detecção de todas as células mesenquimais que se originaram a partir de células epiteliais via EMT, e células mesenquimais expressam todos os marcadores epiteliais antes da transição estar completa. Adaptado de (Kalluri and Weinberg 2009)

Atualmente são reconhecidos três tipos de EMT e representam processos biológicos distintos com alterações na expressão gênica que favorecem a aquisição do fenótipo mesenquimal: EMT Tipo 1 - Associado com a implantação e formação do embrião, desenvolvimento de tecidos e órgãos; EMT Tipo 2 - Associado ao processo de cicatrização e regeneração de tecidos e fibrose de órgãos; EMT Tipo 3 - Associado a células neoplásicas que previamente sofreram alterações genéticas e epigenéticas, especificamente em genes que favorecem a expansão clonal (Shook and Keller 2003; Kalluri and Neilson 2003).

Células de carcinoma que apresentam ativação do processo de EMT podem invadir tecidos adjacentes e metastasiar. Caracteristicamente, células de carcinoma em EMT retêm muitas características epiteliais demonstrando a expressão de fenótipo intermediário o qual contribui para migração, adesão e invasão tecidual (Nieto et al. 2016). As células de carcinomas que conseguem se estabelecer em outra região passam pelo processo conhecido como transição mesenquimal-epitelial, processo que favorece as células a expressarem novamente o fenótipo epitelial contribuindo para a expansão clonal das células cancerígenas e colonização do novo ambiente tumoral (Banyard and Bielenberg 2015; Brabletz 2012).

Um número distinto de alterações moleculares estão envolvidos na ativação do processo de EMT e incluem alteração de fatores transcricionais, expressão de proteínas de superfície celular, reorganização e expressão de componentes do citoesqueleto, síntese de proteases que degradam componentes da matriz extracelular (*Matrix Extracellular - MEC*), moléculas de sinalização oriundas do microambiente tumoral (*e.g.* fatores de crescimento) e mudança na expressão de microRNA's (Banyard and Bielenberg 2015; Nollet, Kools, and van Roy 2000). Essas alterações podem ser avaliadas por meio da expressão gênica diferencial utilizando os principais genes envolvidos nesse processo como biomarcadores.

2.6.1 Marcadores de Transição Epitelial-Mesenquimal

Durante a progressão tumoral observa-se alterações na expressão de genes responsáveis por codificar proteínas que permite adesão e polaridade celular. Essas alterações contrapõem com o aumento da expressão de fatores transcricionais que reprimem a expressão genes epiteliais e ocasionam a expressão de genes responsáveis por codificar características mesenquimais. Esses genes podem ser utilizados para a análise de EMT (Nieto et al. 2016).

Marcadores Epiteliais

Caderina-E (CDH1)

Constituinte das junções aderentes em tecidos epiteliais caderina-E é uma glicoproteína cálcio dependente que atua no estabelecimento e manutenção da polaridade e adesão celular, reconhecimento de células adjacentes por meio do domínio extracelular e interação com o citoesqueleto de actina pela interação entre o domínio citosólico e cateninas (Gonzalez and Medici 2014; Jeanes, Gottardi, and Yap 2008). Caracterizado como supressor de invasão e metástase, caderina-E é um componente chave para a manutenção da integridade epitelial sendo reconhecido como principal alvo dos carcinomas (Berx and van Roy 2009).

Estruturalmente caderina-E é formada por um domínio citoplasmático de 150 aminoácidos, um domínio transmembrana e um domínio extracelular com aproximadamente 550 aminoácidos a qual é subdividida m 5 domínios denominados de repetições extracelular de caderina EC1,EC2,EC3,EC4 e EC5(van Roy and Berx 2008). O domínio extracelular é responsável pela adesão e liga-se ao ectodomínio de caderina-E das

células adjacentes. O domínio citoplasmático, conservado entre as caderinas clássicas, interage com cateninas α e β e liga caderina-E ao citoesqueleto de actina (Goodwin and others 2004).

A mudança no padrão de expressão de caderinas constitui uma característica importantíssima para a aquisição do fenótipo mesenquimal e caracteriza-se pelo bloqueio ou diminuição da expressão de caderina-E e expressão aumentada de caderina-N (Kalluri and Weinberg 2009a). O bloqueio da expressão de caderina-E ocorre a nível de mRNA e proteína por meio de metilação, mutações e controle transcricional (Wheelock et al. 2008; Jeanes, Gottardi, and Yap 2008). A desestabilização das junções aderentes permite a clivagem de caderina-E e degradação pelas metaloproteases (van Roy and Berx 2008). Como consequência, catenina- β fica livre no citoplasma e sua degradação é impedida pela ação da via Wntless - Wnt a qual migra para o núcleo e ativa a via Wnt canonicamente contribuindo de forma substancial para a progressão tumoral mediante a ativação da expressão dos fatores transcricionais – *Snail*, *Twist* e *Zeb-1* e consequentemente, ocorre a inibição de expressão de *CDH1* (Hu et al. 2015).

Zônula Ocludente (ZO1)

Membro da família de proteínas guanilato quinase associada à membrana (Membrane Associated Guanylate Kinases – Maguk), zonula ocludente 1 é uma proteína periférica localizada em regiões juncional e atua recrutando vários tipos de proteínas para a formação da placa juncional, organização do citoesqueleto, transdução de sinal, modulador transcricional e manutenção da polaridade celular (Gonzalez-Mariscal et al. 2016). Em células epiteliais a proteína zônula ocludente é necessária para a formação de junções de oclusão (*Tight Junction – TJ*), estrutura de adesão celular que regula o movimento de íons, macromoléculas e células dentro do espaço paracelular e mantém a polaridade celular bloqueando a difusão livre de lipídeos e proteínas (Runkle and Mu 2013).

A expressão reduzida de *ZO1* correlaciona-se com o desenvolvimento de câncer, dediferenciação celular e prognóstico ruim em vários cânceres (*eg.* pulmão e fígado) e baixo nível de expressão de *ZO1* está relacionado com o surgimento de metástase, onde a depleção de zônula ocludente 1 aumenta a permeabilidade vascular (Gonzalez-Mariscal et al. 2016).

Citoqueratinas 8 e 18 (KRT8 / KRT18)

A mudança fenotípica observada nas células durante EMT envolve alteração na composição dos filamentos intermediários, sendo observado aumento na expressão de vimentina e diminuição de citoqueratinas (Fortier, Asselin, and Cadrin 2013). Citoqueratinas 8 e 18 (*Keratins – K*) expressas em células epiteliais compõe os filamentos intermediários dessas células e têm por função a manutenção da integridade celular, estabilidade mecânica, contato celular, polarização apico-basal, posicionamento das organelas no citoplasma, ancoragem de proteínas na membrana e interação com vias de sinalização celular que regulam apoptose e motilidade celular (Moll, Divo, and Langbein 2008; Oriolo et al. 2007). As queratinas constituem uma grande família de proteínas expressas por 54 genes e são classificadas de acordo com o ponto isoelétrico em tipo I – ácidas (K9-K28) e tipo II – neutra / básica (K1-K8, K71-K80) que formam dois clusters de genes localizados nos cromossomos 17q21.2 e 12q13.13. Entretanto, queratinas são moléculas heteropoliméricas e sua formação e estrutura depende do pareamento das queratinas tipo I e II (Schweizer et al. 2006).

Citoqueratinas 8 e 18 são co-expressas e constituem o par de citoqueratinas primário de células epiteliais (Moll, Divo, and Langbein 2008). Expressa pelos genes *KRT8* e *KRT18* os quais se encontram no mesmo *locus* do cromossomo 12q13.13 e transcritos em sentido inverso (*Invert Repeat*), ambos são utilizados como biomarcadores de EMT devido a alterações patológicas envolvendo diferenciação e proliferação de células cancerígenas (Karantza 2011). Entretanto, a expressão alterada dessas queratinas - *dowregulated* / *overexpression* estão relacionados com a progressão tumoral. A expressão de K8/K18 em células cancerígenas é mantida até aquisição do fenótipo maligno e desprendimento do tumor primário. Após o estabelecimento do sítio metastático as células voltam a expressar K8/K18 por meio do processo de Transição Mesenquimal-Epitelial (*Mesenchymal-Epithelial Transition - MET*) (Karantza 2011). A repressão de K8/18 favorece a invasão celular devido a expressão aumentada de claudina via ativação de PI3K/Akt e NFkB (Fortier, Asselin, and Cadrin 2013). Em alguns carcinomas como melanoma a expressão de K8/K18 é mantida e ocorre a co-expressão de vimentina via ativação de Akt-2, favorecendo a motilidade celular e a invasão de tecidos adjacentes (Chu et al. 1996; Fortier et al. 2010).

Marcadores Mesenquimais

Caderina-N (*CDH2*)

CDH2 é um dos principais genes que se encontra hiperexpresso durante EMT e frequentemente está alterado em cânceres agressivos. O transcrito de *CDH2* é a proteína caderina-N e sua expressão aumentada em células epiteliais neoplásicas faz com que as neoplasias sejam mais agressivas por apresentarem maior capacidade de interagir com células ou tecidos caderina-N positivo como estroma e endotélio. Essa interação facilita o acesso à circulação, penetração e sobrevivência em órgãos distantes da neoplasia primária (Berx and van Roy 2009). Embora o aumento da expressão de caderina-N não faça com que o tumor aumente de volume, potencializa a via de sinalização ERK e aumenta a expressão de MMP9 desestabilizando as junções aderentes e aumento de motilidade (Hu et al. 2015; Berx and van Roy 2009).

Vimentina (VIM)

Componente dos filamentos intermediários do tipo 3 em células mesenquimais, vimentina forma uma rede com organização radial e estende do núcleo para a periferia celular (L. Chang and Goldman 2004). Caracteristicamente os filamentos intermediários formados por vimentina apresentam motilidade e constante organização, sendo facilitado pela interação com a rede de microtúbulos e ação das proteínas motoras cinesina e dineína (Clarke and Allan 2002).

Conservado evolutivamente entre as espécies os filamentos formados por vimentina apresenta similaridade e atuam conferindo resistência mecânica, organização de proteínas envolvidas na adesão, migração e sinalização celular, distribuição espacial das organelas celulares, morfologia nuclear e organização da cromatina (Ivaska 2011; Satelli and Li 2011). Durante o desenvolvimento embrionário vimentina apresenta papel primordial na gastrulação e migração das células que formam a crista neural (Chernoivanenko, Minin, and Minin 2013). Em células tumorais a expressão de vimentina resulta em alterações morfológicas aumentando a capacidade migratória (Mendez, Kojima, and Goldman 2010; Chernoivanenko, Minin, and Minin 2013).

Fibronectina (FN1)

Fibronectina é uma glicoproteína extracelular encontrada na forma solúvel e insolúvel é formada por dois monômeros unidos por pontes dissulfídicas e pelos módulos denominados de F1, F2 e F3. De caráter ubíquo e abundante na matriz extracelular, atua na interação entre célula e matriz extracelular mediando adesão e migração celular,

crescimento, diferenciação, embriogênese e cicatrização (Potts and Campbell 1994; Singh, Carraher, and Schwarzbauer 2010). Estruturalmente é organizada como uma rede de fibrila na superfície celular e interage com receptores de superfície de membrana, sendo a integrina $\alpha 5 \beta 1$ o principal gene receptor (Miyamoto et al. 1998). A interação entre fibronectina e integrinas liga a matriz extracelular ao citoesqueleto e as vias de sinalização intracelular como a via PI3K/AKT (Huveneers et al. 2008).

A utilização de *FN1* como biomarcador para EMT é limitado devido sua expressão ocorrer em todos os tipos de EMT e ser expressa por várias células. Entretanto, sabe-se que em EMT-3 fibronectina é estimulada pela expressão aumentada dos fatores transcricionais *SNAIL* e *TWIST* (Scanlon et al. 2013). Fibronectina tem sido relacionada ao desenvolvimento de vários tipos de cânceres incluindo NPC e está associada à migração e invasão celular (L.-J. Ma et al. 2014; Cao et al. 2015).

Metaloproteinase 2 (MMP2) e Metaloproteinase 9 (MMP9)

A invasão de tecidos adjacentes ao tumor primário requer o ganho da habilidade em degradar membrana basal e matriz extracelular - MEC. Essa habilidade resulta da expressão das gelatinases A ou *MMP2* (72 KDa) e gelatinase B ou *MMP9* (92 KDa) as quais pertencem ao grupo de proteases denominadas de metaloproteases de matriz zinco dependente (Sun et al. 2014). Secretadas na forma de zimogênio, apresentam alta afinidade por colágeno tipo IV e estão relacionados aos processos de angiogênese, invasão, metástase e resposta imune pela clivagem de quimiocinas (Jezierska and Motyl 2009).

Em quase todos os cânceres a expressão de gelatinases encontra-se aumentada. Com capacidade para regular o microambiente tumoral, a expressão de gelatinases ocorre pelas células cancerígenas e do estroma em resposta a sinalização parácrina por meio do estímulo de interleucinas, interferons e fatores de crescimento (Radisky and Radisky 2007; Ala-aho and Kähäri 2005)

Substancialmente, as gelatinases degradam caderina-E e contribui para ativação de EMT – desprendimento das células do carcinoma, degradação de matriz extracelular e migração para o estroma, características essenciais para crescimento, invasão e metástase de neoplasias (Ala-aho and Kähäri 2005). A degradação da membrana basal libera fatores solúveis na circulação que contribuem para a formação no nicho metastático em órgãos distantes. A ação de MMPs expõe epítomos de peptídeos crípticos na matriz extracelular,

modifica integrinas e outras moléculas de adesão em células cancerígenas e por atividade ativam TGF- β , contribuindo para a ativação de EMT (Z. Liu et al. 2010; Radisky and Radisky 2010).

Fatores transcricionais

O programa de EMT pode ser ativado em resposta a diversos sinais que induzem a expressão de fatores específicos de transcrição denominados de EMT-TFs, como *Snail*, *Slug*, *Zeb-1* e *Twist*, os quais estão envolvidos diretamente no desenvolvimento embrionário, cicatrização, fibrose e metástase. Esses fatores atuam na repressão transcricional de caderina-E (Nieto et al. 2016).

Snail 1 e *Slug* (*Snail 2*) fazem parte da superfamília de repressores Snail com domínio dedo de zinco (*Snail superfamily of zinc finger transcriptional repressor*) e estruturalmente, apresentam na região C terminal de 4 a 6 domínios dedo de zinco C_2H_2 e ligante para o motivo E-box (5'-CANNTG-3'), sendo essa a região responsável por se ligar ao DNA (Peinado, Olmeda, and Cano 2007). A expressão desses repressores transcricionais ocorre por meio dos fatores de crescimento EGF, HGF, TGF- β e FGF os quais se ligam aos receptores tirosina quinase (*Receptor Tirosina Kinase – RTK's*) e ativam as vias de sinalização intracelular RAS-MAPK ou PI3K-AKT (Y. Wang et al. 2013). Em células cancerígenas a expressão de *Snail 1* e *Slug* tem como resultado o aumento de motilidade e invasividade devido ao bloqueio da expressão de caderina-E translocação de catenina-B para o núcleo, onde modulará a expressão dos genes *c-Myc* e *Ciclina D1* deflagrando a expressão de características mesenquimais (Eger and Mikulits 2005).

Twist um dos principais indutores de EMT, pertence à família hélice-alfa-hélice básico (*basic-helix-loop-helix – bHLH*). A superexpressão de twist está associada com metástase devido ao aumento da expressão de Caderina-N, síntese de fatores pró-angiogênicos e fator de crescimento endotelial vascular que facilitam a migração e intravasão das células cancerígenas (Wallerand et al. 2010; T. Horikawa et al. 2007). *TWIST* compartilha-se de maneira distinta em relação à *SNAIL*, *SLUG* e *ZEB1* e apresenta maior capacidade em modular a expressão de características mesenquimais do que reprimir a expressão de características epiteliais (Nieto et al. 2016).

Zeb1, membro da família de fatores transcricionais domínio E-box dedo de zinco (*Zinc Finger E-Box Binding*), atua como regulador na expressão de genes epiteliais e mesenquimais

mantendo os níveis balanceados (Y. Liu et al. 2008). Estruturalmente, *ZEB1* apresenta dois domínios dedo de zinco responsável por se ligarem ao DNA na região de elementos promotores E-box CAGGTA/G. A regulação de genes alvos ocorre por meio do recrutamento de repressores e co-ativadores. Um exemplo dessa interação é repressão do gene *CDH1*, onde *ZEB1* atua ligando-se a região promotora E-box do gene e recruta o co-repressor, a proteína ligante de região carboxi-terminal (*C-terminal-binding protein* - CtBp), que atua na remodelação da cromatina conduzindo a repressão de *CDH1* e indução de EMT (Postigo and Dean 1999; Zhang, Sun, and Ma 2015). Os níveis elevados de *Zeb1* correlacionam-se com pobre prognóstico em tumores de origem epitelial, atuando na desregulação de genes epeliais, culminando em metástase e resistência a terapias. *Zeb1* controla uma extensa rede de microRNAs relacionados a diversas funções celulares. Entre essas, observa-se a reorganização do citoesqueleto de actina favorecendo a formação de estruturas pró-migratórias devido à repressão de miR34a e ativação de RHO GTPase, e diferenciação epitelial por meio da repressão miR-181 e membros da família miR-200 (Ahn et al. 2012). No entanto, níveis baixo de *Zeb1* relaciona-se com a transição mesenquimal-epitelial, fenômeno oposto a EMT (Y. Liu et al. 2008).

A expressão alterada dos marcadores de transição epitelial-mesenquimal em células neoplásicas relaciona-se ao acúmulo de mutações. Consequentemente, as células neoplásicas podem disseminar pelo organismo e ocasionalmente gerar metástases, uma das características encontrada no NPC e tem como precursor a proteína LMP1 (Dawson, Port, and Young 2012).

2.7 LMP1 na progressão tumoral

Requerida para a transformação de linfócitos B e estabelecimento do ciclo latente do EBV, LMP1 foi a primeira proteína do EBV a ser identificada com propriedades transformantes (Lo et al. 2004). Experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que LMP1 apresenta capacidade de transformar células e contribui para a formação de linfoma e hiperplasia epitelial (Shair, Schnegg, and Raab-Traub 2009).

Ativa de forma constitutiva nas células, LMP1 atua como ligante independente na ativação das vias de sinalização PI3K, JNK, Rho GTPase, Mapk's e NFkB e influencia – proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (Tsao et al. 2002). As vias de sinalização do NFkB e PI3K/Akt são necessárias a LMP1 para a transformação celular e são mantidas

ativas de forma constitutiva (Shair, Schnegg, and Raab-Traub 2009). LMP1 ativa a via do NFkB por meio das regiões CTAR1 e 2 e aumenta a expressão de proteínas antiapoptóticas como bcl2, citocinas pró-inflamatórias - IL6/IL8 e fatores angiogênicos – *Ciclooxigenase 2* (*Cyclooxygenase 2 - COX2*) e fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor – VGEF*). A ativação de PI3K/Akt está relacionada à proliferação, resistência apoptose, motilidade e sobrevivência celular (Tsao et al. 2002).

Incentivadas pela ativação do processo de EMT, as células neoplásicas de origem epitelial podem apresentar perda de adesão, aumento do potencial invasivo e motilidade celular, contribuindo diretamente para formação de metástases (Thiery 2003). LMP1 ativa o processo de EMT por meio do aumento da expressão de fatores transcricionais Slug, Snail e Twist, sendo uma das principais características a diminuição da expressão de cadherina-E e aumento de caderina-N (Horikawa et al. 2011). A troca de expressão de caderinas resulta em perda de adesão celular, uma das principais alterações observadas na progressão tumoral e relaciona-se com estágios avançados do carcinoma de nasofaringe (Tsai et al. 2006). Além da troca de caderina, células em EMT apresentam aumento da expressão de vimentina, proteína que forma filamentos intermediários de células mesenquimais e aumentada expressão da metaloprotease MMP9, collagenase que degrada principalmente colágeno 4. Esse fenótipo apresentado por células em EMT é propiciado pela LMP1 e caracteriza o carcinoma de nasofaringe como um câncer altamente invasivo e metastático (Lo et al. 2003; Yoshizaki et al. 1998).

Durante a progressão tumoral, células em EMT tipicamente não apresentam características únicas do fenótipo epitelial ou mesenquimal. Estudos recentes demonstram que células em EMT apresentam fenótipo intermediário (híbrido), caracterizado pela co-expressão de fatores epiteliais e mesenquimais favorecendo as células a migrarem de acordo com o ambiente onde se encontram. Células que apresentam o fenótipo intermediário são referidas como metastáveis e reflete em maior flexibilidade para ativar e desativar EMT (Nieto et al. 2016). De forma peculiar, LMP1 modula a interação de moléculas de superfície celular e prepara o ambiente para migração e invasão. A ativação de TGF- β e ativina A por LMP1 aumenta a expressão fibronectina e seu principal receptor - integrina $\alpha 5\beta 1$, uma resposta autócrina que media sobrevivência celular e metástase Durante a migração celular é observado a organização e desorganização de adesão focal (*Focal Adhesion*), mecanismo

mediado pelas integrinas. No processo de formação de adesão focal ocorre a polimerização de fibras de actina e resulta na formação de lamelopódios e filopódios, via ativação de ERK-MAPK por LMP1. (M. A. Morris et al. 2016; Wasil and Shair 2015).

Coletivamente, as alterações induzidas por LMP1 demonstram o papel dessa proteína no desenvolvimento e progressão do carcinoma de nasofaringe.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente estudo visa verificar a hipótese de que diferentes formas da oncoproteína LMP1 do EBV apresentam propriedades distintas no tocante a fenômenos relevantes da progressão de cânceres, tais como invasão celular *in vitro* e EMT.

3.2 Objetivos específicos

1. Validar modelos *in vitro* de células humanas expressando de forma estável a proteína LMP1 dos isolados B95-8 e M81 do EBV;
2. Analisar o grau de invasão e migração *in vitro* de células humanas expressando a proteína LMP1 dos isolados B95-8 e M81 do EBV;
3. Investigar as propriedades da proteína LMP1 dos isolados B95-8 e M81 em termos da regulação de componentes do programa de EMT.

As ORFs amplificadas de EBV *BNLF1* foram inseridas no vetor-base comercial bicistrônico pEF1α-IRES-ZsGreen1 (Clontech, Mountain View CA, USA) (Figura 8). Esse plasmídeo, doravante denominado pZsGreen, possui sequência interna de entrada ribossomal do vírus da encefalomiocardite (*Encephalomyocarditis Virus Internal Ribosome Entry Site - IRES*), posicionada entre o sítio múltiplo de clonagem (*Multiple clone site – MCS*) e de gene que codifica uma versão aprimorada de uma proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein – GFP*), a ZsGreen1. Assim, possibilita expressão contínua e simultânea da proteína de interesse (LMP1) e da proteína repórter (ZsGreen1). A expressão contínua do transcrito de LMP1 é dirigida pelo promotor para fator de alongamento humano alfa 1 (*Human Elongation Factor 1 Alpha - EF1-α*), que possibilita expressão robusta e constitutiva do transgene.

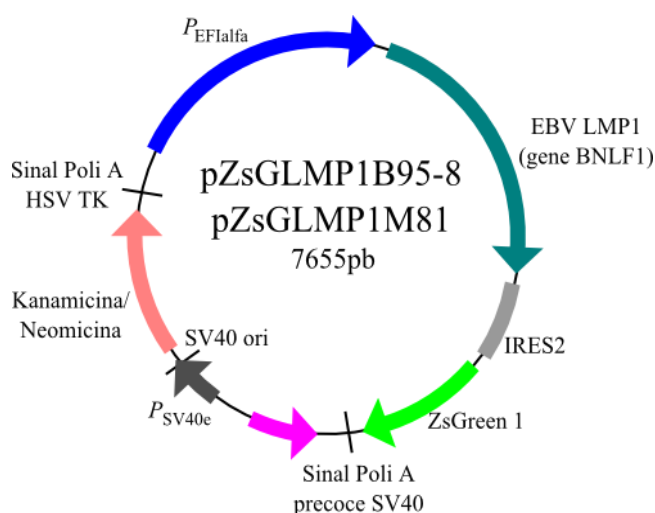


FIGURA 8 Mapa dos construtos gerados com o gene *BNLF1* do EBV, codificador da oncoproteína viral LMP1 (Müller-Coan 2016)

4.2 Linhagens celulares e transfecção celular

Como modelos experimentais foram empregadas as linhagens NP69 (células imortalizadas de epitélio nasofaríngeo) gentilmente cedidas pela Professora Dr^a. Ethel Cesarman (*Cornell University, NY – USA*) e HEK293 (células embrionárias de rim humano). Adicionalmente, foram empregadas como controles em experimentos de expressão gênica as linhagens RWPE1 (células epiteliais imortalizadas de próstata humana) gentilmente cedidas pela Professora Dr^a. Flávia Delella (Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP), HaCat (queratinócitos humanos imortalizados e aneuploides), FGH (fibroblatos gengivais humanos) e Saos-2 (células de sarcoma osteogênico humano primário) ambas cedidas pelo Professor Dr. Willian Zambuzzi (Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP). Células NP69 foram cultivadas com meio para queratinócitos (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor – EGF*) e extrato de pituitária bovina (*Bovine Pituitary Extract – BPE*). Células HEK293, HaCat e FGH foram mantidas com meio *Eagle* modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM*) suplementado com 10% de SFB, e células Saos-2 com meio McCoy's 5A modificado (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) suplementado com 10% SFB. Todas as linhagens tiveram seus meios acrescidos de 0,4% de gentamicina e foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. As células foram rotineiramente subcultivadas quando alcançavam confluência de 80%. Para tanto, foram dissociadas com tripsina 0,25%, centrifugadas a 240 x g por 5min, lavadas com solução salina fosfato tamponada de Dulbecco (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Salin – DPBS*) e semeadas.

Procedeu-se extração de DNA de aproximadamente 1,0x10⁶ células de cada linhagem empregando o sistema comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com protocolo do fabricante, para procedimentos de reautenticação celular e pesquisa de contaminação por micoplasma. O DNA obtido foi quantificado por espectrometria UV em equipamento NanoVue (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK, England) e armazenado a -20°C até uso oportuno. A autenticidade genética das células foi verificada 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 4.

QUADRO 4 Autenticação de linhagens de células. Todas as linhagens utilizadas foram analisadas comparando-se os perfis de STR obtidos com os apresentados em biorepositórios ou publicados na literatura.

Linhagem	Linhagem e perfil STR obtido	Perfil referência
FGH:	TH01: 9, 9.3; D21S11*: 29, 30; D5S818: 12, 13; D13S317: 9, 13; D7S820: 10, 11; D16S539: 11, 11; CSF1PO: 10, 12; AMEL: X, X; vWA: 15, 18; TPOX: 9, 11	¹ N.d.
HaCat:	TH01: 9.3; D21S11: 28,30.2; D5S818: 12; D13S317: 10,12; D7S820: 9,11; D16S539: 9,12; CSF1PO: 9,11; AMEL: X; vWA: 16,17; TPOX: 11,12	² CLS 300493
HEK 293:	TH01: 7, 9.3; D21S11: 28, 30.2; D5S818: 8; D13S317: 12, 14; D7S820: 11, 12; D16S539: 9, 13; CSF1PO: 11, 12; AMEL: X; vWA: 16, 19; TPOX: 11	³ ATCC CRL-1573
NP69:	TH01: 7; D21S11: 31; D5S818: 11; D13S317: 10, 12; D7S820: 11; D16S539: 11, 12; CSF1PO: 12, 13; AMEL: X, Y; vWA: 16, 19; TPOX: 11	(S. Y.-Y. Chan et al. 2008)
RWPE-1	TH01: 8,9.3; D5S818: 12,15; D13S317: 8,14; D7S820: 10,11; D16S539: 9,11; CSF1PO: 13; AMEL: XY; vWA: 14,18; TPOX: 8,11	ATCC CRL 11609
Saos-2	TH01: 6,9; D5S818: 12; D13S317: 12,13; D7S820: 8,10; D16S539: 12,13; CSF1PO: 10; AMEL: X; vWA: 18; TPOX: 8)	ATCC HTB 85

¹N.d.: não disponível publicamente (células primárias). ²CLS: Cell Line Service; ³ATCC: American Type Culture Collection

Todas as linhagens foram também certificadas como livres de contaminação por *Mycoplasma* sp pela pesquisa dos micro-organismos por meio de reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) com iniciadores previamente descritos (Uemori et al. 1992).

Para as transfecções gênicas, células NP69 e HEK293 foram cultivadas conforme previamente indicado até confluência de 80%, quando foram dissociadas com tripsina, lavadas com DPBS e semeadas em placa de 24 poços ($7,5 \times 10^4$ células/poço). Após incubação por 24h, as células foram transfectadas com o vetor-base pZsGreen ou os construtos pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81 empregando o reagente *Effectene Transfection Reagent* (Qiagen, Valencia, CA, USA), com protocolo baseado nas recomendações do fabricante. Os experimentos foram efetuados em 72h pós-infecção, tempo determinado considerando os resultados obtidos em termos de taxa de transfecção, estimada com base na fração de células expressando GFP.

4.3 Imunodetecção de EBV LMP1

A confirmação da expressão de LMP1 em nível proteico nas células transfectadas foi efetuada por meio de *western blotting* (WB) empregando lisados totais das células HEK293 e NP69 em 72h pós-transfecção. Os lisados celulares foram gerados empregando tampão radioimunoprecipitação modificado (*Radioimmunoprecipitation Assay Buffer* - RIPA) e subsequentemente foi feito a quantificação de proteínas totais empregando o reagente *Pierce BCA Protein Assay Kit* (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*), de acordo com o protocolo do fabricante. Em síntese, 20 µg de proteínas totais de cada amostra foram incubados com β-mercaptoetanol a 95°C por 5min e subsequentemente aplicados em gel de poliacrilamida 10% contendo dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulphate* - SDS). Foi efetuada eletroforese a 120V por 90 min em sistema Mini Protean II Dual Slab Cell (*BioRad, Hercules, Califórnia, EUA*), seguindo-se transferência das proteínas separadas para membrana de nitrocelulose a 330A por 90min em sistema *Mini Transblot Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad). Após a transferência as membranas foram coradas em solução de Ponceau para análise da eficiência de transferência. As membranas foram então descoradas em solução TBST (Tris/Salina Tamponada/Tween-20 – fórmula: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 0,5 ml e H₂O quantidade suficiente para 1.0 litro) e submetidas a

bloqueio de ligações inespecíficas por meio de lavagem com TBST contendo 5% de albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin - BSA*) por 2h sob agitação constante.

Para imunomarcação foram utilizados anticorpo contra a proteína LMP1 do EBV clones CS1/2/3/4 (*Santa Cruz Biotechnology, Dalllas, Texas - EUA*) sintetizado em camundongo (mouse) e, como controle, anticorpo para β -Actina (Sigma A2066) sintetizado em cabra (*goat*). Ambos anticorpos primários foram empregados diluídos 1:1000 em BSA e incubados com a membrana por 12h. Ao término da incubação dos anticorpos primários a membrana foi lavada com solução TBST por 10min e os anticorpos secundários foram empregados anti-camundongo (*Santa Cruz Biotchnology*) e anti-cabra (Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluídos 1:2000 em BSA e aplicados para incubação por 2h em temperatura ambiente. Após as incubações, a membrana foi lavada com TBST por 5 vezes - 3,0 minutos cada lavagem. Para detecção, a membrana foi incubada por 1min. com solução para quimiluminescência em câmara escura (*Enhanced Chemiluminescent – ECL, Life*) conforme instruções do fabricante e o registro feito no analisador de gel G:BOX F3 Fluorescence Imaging System (*Syngene, Bommasandra, Bengaluru, India*).

4.4 Análise funcional dos vetores contendo as ORFs de LMP1

Para validação funcional de LMP1 foi realizado o ensaio de luciferase utilizando o vetor repórter pcDNA3.1-NFkBLuc, o qual proporciona a expressão da luciferase do vagalume dependente de ativação de elemento NFkB-responsivo em seu promotor. Células HEK293 foram transfectadas com os vetores pcDNA3.1-NFkBLuc e o vetor pGL4.74 (Promega), este último para expressão constitutiva da luciferase do cnidário *Renilla reniformis*, e os construtos pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81, para expressão de EBV LMP1. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços utilizando o sistema *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega), conforme protocolo do fabricante. As leituras de luminescência foram efetuadas em equipamento GloMax Explorer (Promega) e os resultados foram obtidos para três experimentos independentes empregando triplicatas.

4.5 Viabilidade Celular

Foi efetuada análise de viabilidade celular por meio de ensaio colorimétrico com reagente *CellTiter®Aqueous Solution*, de acordo com o protocolo do fabricante (Promega). Para tanto, $1,0 \times 10^5$ células (HEK293 ou NP69) foram semeadas por poço em placa de 24

poços. Após 24h as células foram transfectadas com o vetor base pZsGreen e os vetores pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81, conforme previamente indicado. As células foram então tripsinizadas e incubadas por 60 min com o reagente *CellTiter[®] Aqueous Solution* em placa de 96 poços, seguindo-se leitura a 490nm em equipamento leitor de microplacas BioRad modelo 680 (Bio-Rad).

4.6 Estimativa das taxas de morte celular por apoptose

As taxas de apoptose nas células expressando LMP1 dos isolados B95.8 e M81 do EBV foram estimadas por meio de ensaio baseado na emissão de luminescência em decorrência de ativação das caspases 3 e 7. Para tanto, $1,5 \times 10^4$ células transfectadas transientemente (HEK293 ou NP69) com os vetores base pZsGreen, pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1-M81 foram semeadas por poço em placa de 96 poços, incubadas a 37°C e atmosfera 5% CO₂ por 24h. A ativação de caspases foi estimada com o sistema *ApoTox-Glo[™] Triplex Assay* (Promega) empregando protocolo fornecido pelo fabricante e leituras efetuadas em equipamento GloMax Explorer (Promega). Resultados foram obtidos para três experimentos independentes.

4.7 Estimativas de migração e invasão celular *in vitro*

A análise de migração celular das células transientemente transfectadas foi efetuada empregando insertos de 0,8 µm (*Greiner Bio-ONE, Nürtingen, Germany*) em placas de 24 poços. Cada poço da placa foi preenchido com 600 µl de meio DMEM enriquecido com 5% SFB para quimioatração. Em seguida, os insertos foram encaixados na placa e foram semeadas $1,0 \times 10^5$ células por inserto, às quais foram acrescidos 200 µl de meio sem SFB. O conjunto foi incubado por 12h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Subsequentemente o conjunto foi desmontado e a parte interna do inserto foi limpa com auxílio de haste de algodão e lavada com solução salina de tampão fosfato (*Phosphate Buffer Saline – PBS*). A fixação das células foi então efetuada com imersão dos insertos em metanol por 10min, seguindo-se coloração com azul de toluidina por 30s. A taxa de migração celular foi estimada por meio de contagem das células que alcançaram a face externa da membrana do inserto em microscópio óptico invertido Primo Vert Inverted Microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) empregando magnificação de 400x.

A análise do potencial de invasão *in vitro* das células transientemente transfectadas foi realizada com insertos de 0,8 µm cobertos com mimético de matriz extracelular *Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix* (Life Technologies). O mimético (preparado de acordo com protocolo do fabricante) foi depositado na face interna dos insertos em quantidade de 175 µl/cm². Após 30min de polimerização, os insertos foram encaixados em placas de 24 poços e preenchidos com 600 µl de meio DMEM enriquecido com 20% SFB. Subsequentemente foram semeadas 1,0 x 10⁵ células por inserto em 200 µl de meio de cultura celular sem SFB. O conjunto foi incubado em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 18h. Após esse período o mimético de matriz extracelular foi retirado dos insertos e descartado. As células nos insertos foram então fixadas em metanol por 10min, seguindo-se coloração em azul de toluidina por 30s. A taxa de invasão celular foi estimada por meio de contagem das células que alcançaram a face externa do inserto em microscópio óptico invertido Primo Vert Inverted Microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) empregando magnificação de 400x.

4.8 Análise de expressão gênica em nível transcricional

Para análise expressão gênica diferencial, células HEK293 foram transfectadas transientemente com os vetores base pZsGreen, pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81, sendo feito a extração de RNA 72h após a transfecção. Devido ao não estabelecimento da linhagem NP69 expressando de forma estável a proteína LMP1 e a baixa eficiência nos experimentos de transfecção (40% da células), para trabalhar com grupos homogêneos de células expressando a proteína LMP1 e obter melhores resultados em análise de expressão gênica, células NP69 foram transfectadas transientemente com os vetores base pZsGreen, pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. Após 72h, as células foram separadas por meio de selecionador de células ativado por fluorescência (*Fluorescence-Activated Cell Sorting – FACS*), efetuada no Centro de Apoio e Facilidades à Pesquisa (CEFAP) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

Amostras de RNA total das células transfectadas foram extraídas utilizando o sistema *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) e submetidas a análise de quantidade e pureza por meio de espectrometria UV com equipamento Nanovue (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Adicionalmente, o RNA obtido foi avaliado quanto à qualidade em analisador de micro fluídos *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), sendo obtido Índice de

integridade do RNA (*RNA Integrity Number* – RIN) superior a 7,0 (Schroeder et al. 2006). As amostras de RNA foram então tratadas com DNase e armazenadas a -80°C até uso oportuno. A produção de cDNA foi efetuada com a enzima transcriptase reversa *SuperScript® IV* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 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 *SuperScript* 1x, 10mM DTT, 2U de inibidor recombinante de RNase, e 200U da enzima. As reações foram executadas com incubação inicial a 65°C por 5min, seguida de 23°C - 10min, 50°C -10min, e 80°C -10min.

Os seguintes genes cujos produtos são relevantes em termos de EMT foram selecionados para compor painel de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para análise de expressão em nível transcricional: *CDH1* (Caderina-E), *ZO1* (Zônula de Oclusão 1), *KRT8* (Citoqueratina 8) e *KRT18* (Citoqueratina 18), associados a fenótipo epitelial; *CDH2* (Caderina-N), *Vim* (Vimentina), *FN1* (Fibronectina), *MMP2* (Metaloprotease 2), *MMP9* (Metaloprotease 9) associados ao fenótipo mesenquimal e codificadores de fatores transcricionais *SNAI2* (Snail Family Transcriptional Repressor 2 – *SLUG*), *SNAI1* (Snail Family Transcriptional Repressor 1 - *SNAIL*), *TWIST* (Basic helix-loop-helix transcription factors) e *ZEB1* (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1). As estimativas dos níveis de expressão gênica foram calculadas normalizando os resultados dos genes de interesse pelos obtidos para os controles endógenos *RPS18* (Ribosomal Protein S18), *RPS13* (Ribossomal Protein 13S) e *HSPCB* (Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1) .

As sequências para os iniciadores de qPCR para cada um dos genes indicados foram obtidas da literatura e analisadas por meio de anotação gênica empregando sequências disponíveis na base de nucleotídeos do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*– NCBI) dos EUA. Com base na anotação, foram verificados regiões de anelamento de iniciadores *sense* e *antisense*, potencial de formação de dímeros e outras estruturas indesejáveis, e os tamanhos dos amplicons esperados após amplificação por qPCR. Iniciadores considerados apropriados e selecionados para os experimentos (apresentados no **Quadro S1**) foram enviados para síntese dos oligonucleotídeos em serviço especializado (Sigma-Aldrich).

Após síntese, os iniciadores foram submetidos a validação e padronização das condições de PCR empregando as seguintes condições iniciais de reação: tampão de PCR 1x

(100mM Tris-HCl pH 8,5 / 500mMKCl), 2,5 mM MgCl, 0,20 mM dNTP, 0,30μM de cada iniciador, 1U de enzima DNA Polimerase convencional e 200ng de cDNA. As condições iniciais de termociclagem foram: 1 ciclo a 96°C-5 min; 35 ciclos a 94°C-40s, 55°C –1 min, e 72°C-40s (35x); 72°C- 10 min, finalizando a 4°C. A análise de expressão gênica diferencial dos alvos selecionados para EMT foi efetuada por qPCR com reagentes *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega) empregando 5,0μl de *master mix*, 0,30 mM de cada iniciador e 200 ng/cDNA. O programa de termociclagem empregado foi 95°C - 2 min; 40 ciclos a 92°C por 30s, 59°C por 20s, e 72°C por 30s, e conclusão com rampa de temperatura (60°C a 95°C). Para determinação de temperatura ótima de anelamento de cada par de iniciadores foi realizada PCR com gradiente de temperatura empregando as condições previamente indicadas, exceto pelas condições de anelamento, definidas em 57,1°C, 59,2°C e 60,1°C por 40s.

Os pares de iniciadores empregados nos experimentos de qPCR foram avaliados quanto à eficiência de amplificação empregando curva de diluição composta por 6 amostras-referência diluídas a 1:2. As eficiências de amplificação (E) foram calculadas pela fórmula $E = 10^{-(1/\text{slope})}$ (Svec et al. 2015) e estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1 Dados calculados para análise de eficiência de amplificação com os iniciadores utilizados nos experimentos de qPCR para avaliação da expressão de genes associados à EMT

Gene-alvo	S/p ¹	Ef ²	Gene-alvo	S/p ¹	Ef ²	Gene-alvo	S/p ¹	Ef ²
18S	-3,43	1,95	HSP90AB1	-3,44	1,95	SNAI1	-3,41	1,96
CDH1	-3,4	1,96	KRT18	-3,3	2	SNAI2	-3,23	2,03
CDH2	-3,32	2	KRT8	-3,54	1,91	TWIST	-3,45	1,94
EBV BNLF1 ³	-3,33	2	MMP2	-3,41	1,96	VIM	-3,41	1,97
FN1	-3,18	2,06	MMP9	-3,36	1,98	ZEB1	-3,23	2,03
GAPDH	-3,24	2,03	RPS13	-3,31	2	ZO-1	-3,17	2,06

¹ Slope calculado; ² Eficiência calculada; ³ Codifica LMP1

Os dados obtidos nos experimentos de qPCR foram submetidos ao seguinte cálculo:

$$\text{Taxa de expressão} = \frac{(\text{Ef. Alvo})^{\Delta\text{Ct Alvo (Controle - Alvo)}}}{(\text{Ef. Ref.})^{\Delta\text{Ct Ref. (Controle - Alvo)}}$$

Onde,

- Ef. alvo = eficiência do iniciador para gene alvo
- Ef. referência = média da eficiência do iniciadores para genes endógenos
- ΔCt alvo = endógeno grupo analisado – gene alvo grupo analisado
- ΔCt ref= endógeno grupo controle – menos gene alvo grupo controle (Pfaffl 2001).

Foi constituído um painel de expressão gênica com alvos selecionados para distinguir possíveis alterações relacionadas à expressão de produtos associados aos fenótipos epitelial ou mesenquimal das células HEK293 e NP69 após transfecção com os vetores contendo as ORFs das variantes da proteína EBV. A referência de expressão gênica relacionada ao fenótipo epitelial foi baseada na expressão obtida para os alvos nesse painel para as linhagens Hacat e RWPE-1 (células epiteliais), e para o fenótipo mesenquimal foram empregadas as como referência as linhagens FGH e Saos2 (endodérmicas e mesodérmicas, respectivamente).

4.9 Análise estatística

Foi realizada inicialmente um teste de Normalidade e verificou-se que os dados apresentavam distribuição simétrica, desse modo optou-se pelo Teste T de Student para realizar comparação entre grupo e expressão gênica. Para as variáveis que apresentaram mais de dois níveis de comparação (grupo) – viabilidade celular, ensaio de ativação de caspase 3/7 e expressão do gene *BNLF1* foi realizado ANOVA seguida de Tukey para as comparações múltiplas. Já para os dados de contagem de células – ensaio de migração e invasão, quando comparadas entre os grupos foi ajustado um Modelo Linear Generalizado com Distribuição Binomial Negativa (GENMOD). Considerou-se $p \leq 0,05$ como nível de significância com intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas foram feitas no programa SAS, versão 9.3.

5 Resultados

5.1 Expressão e atividade de EBV LMP1 nas células transfectadas transientemente

A Figura 9 ilustra células HEK293 e NP69 não-transfectadas e transfectadas com os construtos gerados para expressão de EBV LMP1 e empregados para os experimentos efetuados no presente estudo.

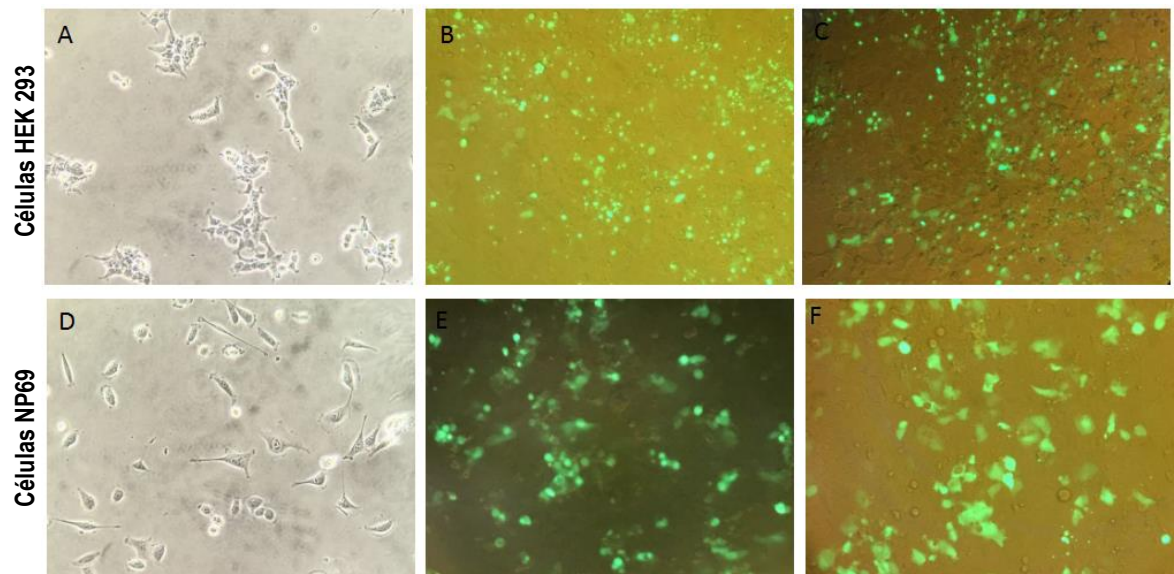


FIGURA 9 Células HEK293 não-transfectadas observadas em microscópio com contraste de fase (magnificação de 100x) (A), células transfectadas com vetor pZsGLMP1_B95.8 (B) e com pZsGLMP1_M81 (C), observadas em microscopia de fluorescência pela expressão da proteína verde fluorescente (GFP) (magnificação de 100x). Em (D), (E) e (F), células NP69 não-transfectadas, transfectadas com o vetor pZsGLMP1_B95.8e pZsGLMP1_M81, respectivamente (magnificação de 100X). As imagens A e D representam momentos distintos em relação ao registro das células transfectadas representados em B,C,E e F.

A expressão de EBV LMP1 em nível transcricional foi constatada em ambos os isolados do EBV, conforme demonstrado na Figura 10.

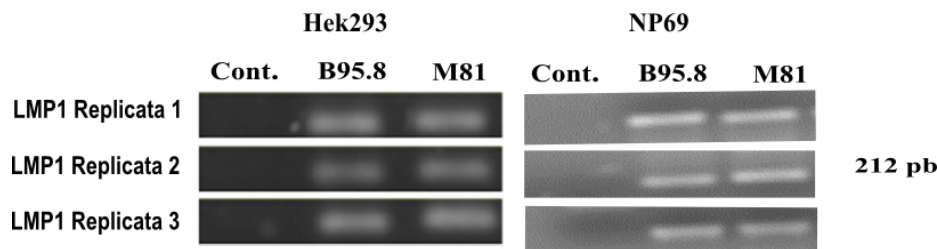


FIGURA 10 Análise dos produtos de PCR após eletroforese em gel de agarose efetuada para detecção de transcritos para a oncoproteína LMP1 dos isolados B95.8 e M81 do EBV, expressos em células HEK293 e NP69 transfectadas com o vetor-base e os vetores experimentais pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. Em todas as replicatas de células transfectadas com os construtos contendo a ORF do gene viral *BNLF1* observa-se o amplicon esperado de 212pb.

Além de expressarem os transcritos de EBV LMP1, os construtos gerados efetivamente proporcionaram expressão da oncoproteína viral, conforme averiguado por imunodeteção efetuada empregando lisados de células HEK293 transientemente transfectadas (Figura 11).

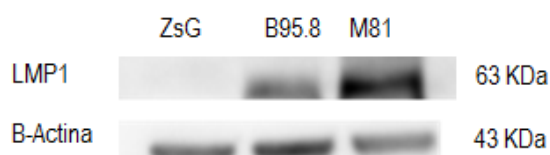


FIGURA 11 Expressão de LMP1 em células HEK293 transfectadas transientemente com o vetor base pZsGreen e os vetores pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. β -Actina: controle endógeno.

A oncoproteína viral LMP1 expressa nas células transfectadas efetivamente proporcionou ativação da via NF- κ B, conforme ficou demonstrado pelo ensaio de luciferase (Figura 12). A atividade de luciferase proporcionada pela ativação do elemento NF- κ B-responsivo em seu promotor pela ação de EBV LMP1 foi significativamente maior nas células expressando as variantes B95.8 e M81 da oncoproteína viral em relação ao controle (vetor-base), não diferindo entre ela.

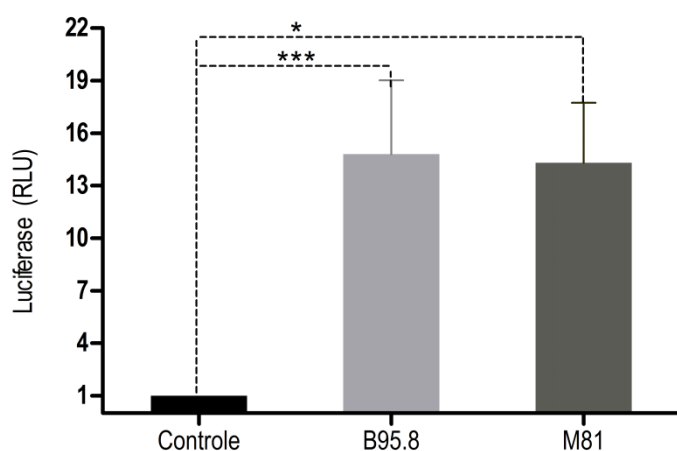


FIGURA 12 Ensaio da luciferase expressa sob regulação de NF- κ B induzido por EBV LMP1 para análise funcional dos vetores contendo as ORFs de LMP1'. Células HEK293 expressando as variantes de LMP1 B95.8 e M81 apresentam maior atividade de luciferase NF- κ B-responsiva em relação às células transfectadas com o vetor-base base (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$, ANOVA)

5.2 Viabilidade celular e apoptose

Conforme observado na Figura 13, células HEK293 não apresentaram alterações significativas de viabilidade em função da expressão das variantes B95.8 e M81 de EBV LMP1. Entretanto, células NP69 expressando ambas variantes B95.8 e M81 da oncoproteína viral apresentaram menor viabilidade em relação às células transfectadas com o vetor-base. Entre as variantes de EBV LMP1, células expressando M81 apresentaram menor viabilidade quando comparado a células expressando a variante B95.8 de EBV LMP1 ($p \leq 0,5$ ANOVA).

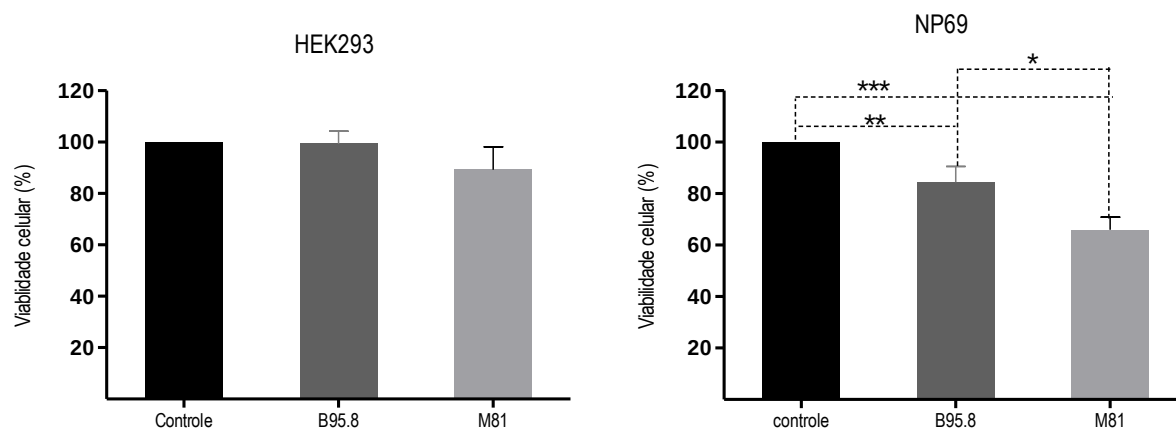


FIGURA 13 Ensaio de viabilidade celular. Células HEK293 e NP69 transfectadas com o vetor-base controle pZsGreen, e os vetores experimentais pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. A viabilidade celular para células HEK293 transfectadas foi semelhante para as três condições apresentadas ($p \geq 0,05$; ANOVA). Para NP69, células expressando as variantes EBV LMP1 apresentaram menor viabilidade celular em relação ao controle, sendo significativo ($**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$; ANOVA). Entre as variantes, células expressando LMP1 M81 apresentaram menor viabilidade em relação a células expressando LMP1 B95.8 ($*p \leq 0,05$; ANOVA).

Em relação as taxas de apoptose (estimadas pela ativação de caspases 3 e 7), células HEK293 e NP69 não apresentaram diferenças significativas nas três condições experimentais avaliadas (Figura 14), ($p \geq 0,05$; ANOVA). Considerando os resultados da análise de viabilidade celular, esse dado sugere que a menor viabilidade notada para células expressando a variante M81 de EBV LMP1 (Figura 13) esteja relacionado as propriedades de ativação lítica que EBV M81 apresenta.

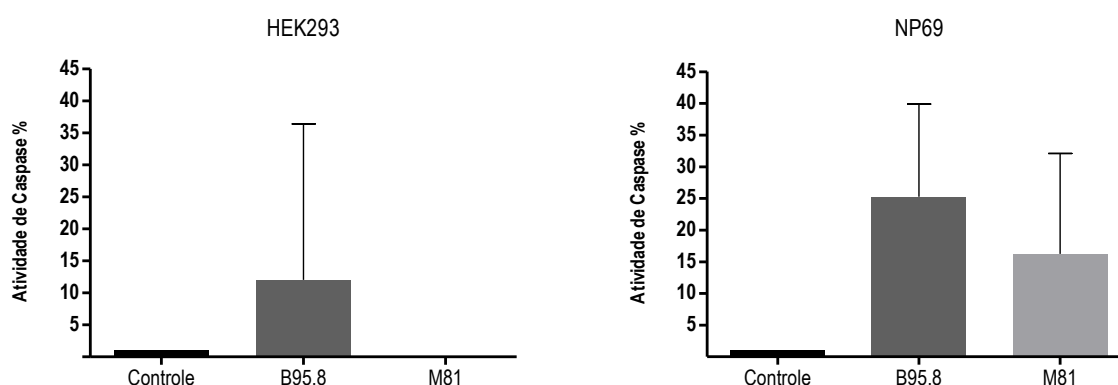


FIGURA 14 Ensaio de ativação de caspase . Células HEK293 e NP69 transfectadas com o vetor-base pZsGreen (controle), pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. Para ambas linhagens HEK293 e NP69 a ativação de caspase não foi significativa entre os grupos analisados ($p \geq 0,05$, ANOVA).

5.3 Migração e invasão celular *in vitro*

Conforme ilustrado na Figura 15, as taxas de migração *in vitro* foram significativamente maiores em células expressando EBV LMP1 em relação ao controle grupo

controle ($p \leq 0,05$; GENMOD), mas foram equivalentes para ambas as variantes da oncoproteína viral (B95.8 e M81).

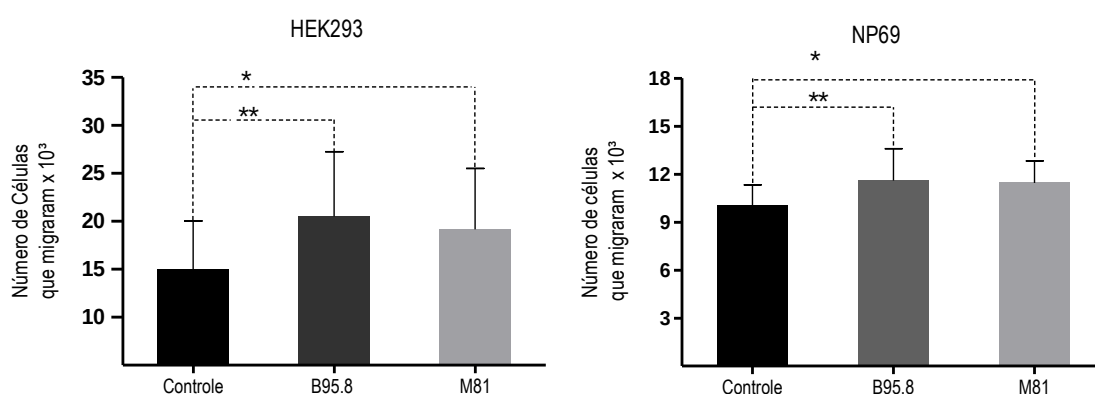


FIGURA 15 Ensaio de migração celular *in vitro*. Número de células HEK293 e NP69 que migraram após 12 horas. Ambas linhagens transfectadas com os vetores pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81 apresentam número de células que migraram significativamente maior em relação ao grupo controle (* $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,001$ - GENMOD).

A análise de invasão foi feita com células HEK293 e NP69 transfectadas transientemente com o vetor base e os vetores pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. Após 18 horas de semeadura, os insertos foram analisados. Ambas as linhagens expressando as variantes de LMP1 apresentaram maior taxa de invasão em relação ao controle ($p \leq 0,05$, GENMOD) (Figura 16). Entretanto, quando comparadas, não apresentam variação significativa ($p \leq 0,05$, GENMOD).

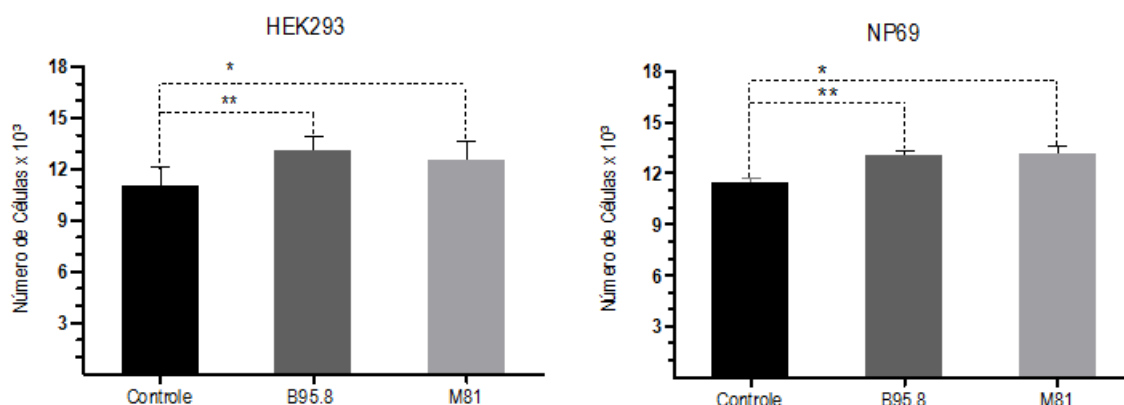


FIGURA 16 Ensaio de invasão celular. Células HEK293 e NP69 transfectadas com o vetor-base pZsGreen (controle), pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. As células expressando as variantes EBV-LMP1 B95.8 e M81 apresentaram maior capacidade de invasão em relação as células do grupo controle (* $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,001$, GENMOD). Entretanto, quando comparadas as variantes de LMP1 não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$ GENMOD).

5.4 Análise de expressão gênica diferencial

A análise de expressão gênica em nível transcricional por qPCR foi efetuada a partir do RNA total extraído de células HEK293 e NP69 transfectadas transientemente (72h) com o vetor base e construtos gerados para expressão de LMP1 variantes B95.8 e M81 do EBV. A expressão do gene *BNLF1* (Figura 17) nas células transfectadas com a variante M81 em relação a B95.8 apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,001$; ANOVA). A variação da expressão entre os experimentos aponta a variação que ocorreu durante a transfecção para ambas linhagens. Experimento feito em triplicata biológica e técnica.

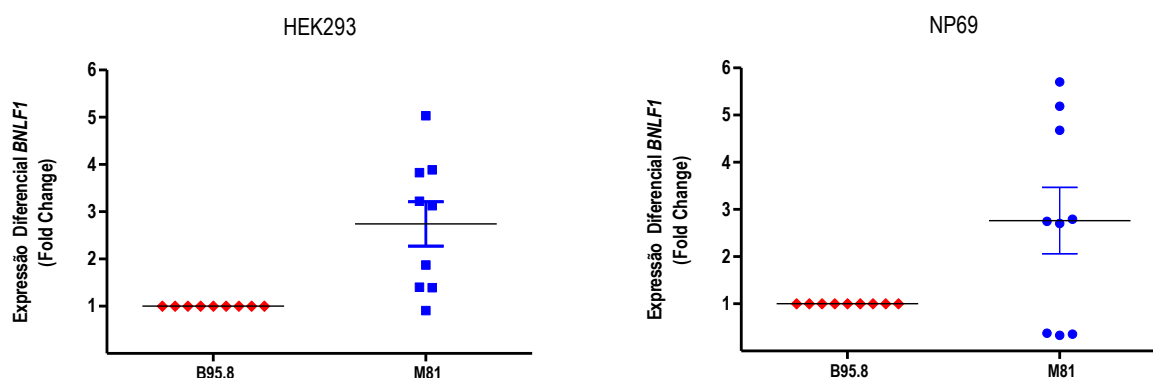


FIGURA 17 Expressão diferencial das variantes gênicas de *BNLF1* que codifica LMP1. Ambas as linhagens de células HEK293 e NP69 (selecionadas por FACS) transfectadas com o vetor pZsGLMP1_M81 apresentaram maior expressão para o gene *BNLF1* em relação ao grupo controle (células transfectadas com o vetor pZsGLMP1_B95.8 ($p \leq 0,001$; ANOVA).

Em geral, a expressão de EBV LMP1 em células HEK293 e NP69 transfectadas esteve associada a um aumento da expressão de genes cujos produtos estão relacionados ao fenótipo mesenquimal (Figura 18), mas não houve diferenças consistentes na expressão gênica em relação às variantes B95.8 e M81. Para células HEK293 expressando as variantes de LMP1, os genes *CDH2* e *SNAI1/SNAI2* são menos expressos em relação ao grupo controle. Células HEK293 expressando a variante LMP1 B95.8 apresentaram alteração para *MMP9* duas vezes mais em relação a células expressando a variante LMP1 M81, mas não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,5$, Teste T Student). Para os outros genes, não foram encontradas alterações. Por outro lado, células NP69 expressando as variantes da LMP1 B95.8 e M81 (Figura 19) quando comparadas não apresentaram diferenças

significativas para os genes analisados ($p \geq 0,5$, Teste T Student). Entretanto, apresentaram alterações em relação ao grupo controle sendo suprimido a expressão de *ZEB1*; aumento da expressão de *SNAI2*, *TWIST*, *CDH2*, *VIM*, *FN1* e *MMPs*. A avaliação do marcador epitelial *CDH1* em células NP69 não foi possível devido a oscilações nos resultados de qPCR para esse gene do grupo controle (células transfectadas com vetor-base). As alterações encontradas em NP69 expressando as variantes de LMP1 estão associadas ao fenótipo mesenquimal e demonstram que LMP1 ativa a expressão de genes associados ao processo de EMT.

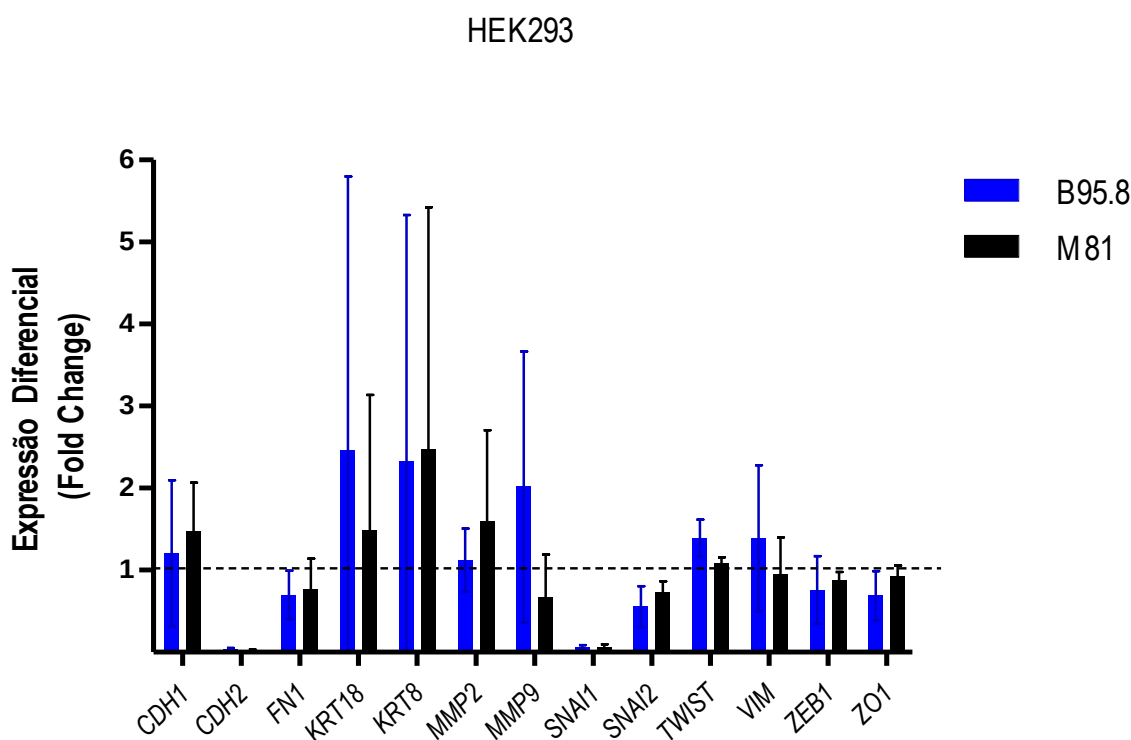


FIGURA 18 Expressão diferencial dos transcritos de genes selecionados envolvidos na EMT avaliados em painel de qPCR para células HEK293 transfectadas com os vetores pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. A linha pontilhada representa o grupo controle (células transfectadas com o vetor-base) sendo significativo *Fold Change* $\geq 2,0$. Os dados de expressão dos genes de interesse foram obtidos após normalização feito pelas médias dos ciclos limiar (Threshold Cycle – Ct) dos genes de referência RPS18, RSP13 e HSP90AB1. Células expressando LMP1_B95.8 apresentaram alteração para MMP9 entretanto, não houve diferença significativa para os genes analisados entre as variantes ($p \leq 0,05$, Teste T Student).

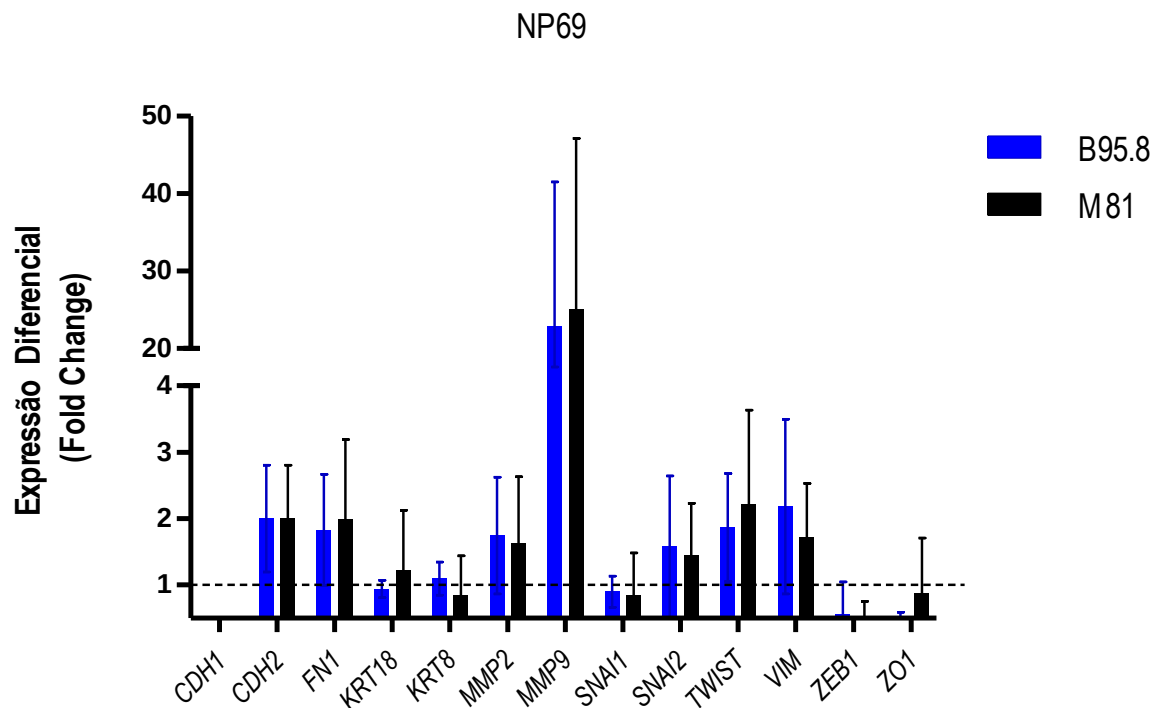


FIGURA 19 Expressão diferencial dos transcritos de genes selecionados envolvidos na EMT avaliados em painel de qPCR. Experimentos efetuados a partir de RNA total de células NP69 transfectadas com os vetores pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81 selecionadas por FACS. A linha pontilhada representa o grupo controle (células transfectadas com o vetor-base) sendo significativo *Fold Change* $\geq 2,0$. Os dados de expressão dos genes de interesse foram obtidos após normalização feito pelas médias dos ciclos limiar (*Theshold Cycle – Ct*) dos genes de referência *RPS18*, *RSP13* e *HSP90AB1*. Células expressando as variantes de LMP1 apresentaram aumento na expressão de genes mesenquimais *CDH2*, *VIM*, *FN1*, *MMP2* e *MMP9* em relação ao grupo controle. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas para os genes analisados entre as variantes de LMP1 ($p \leq 0,05$, Teste T Student).

6 Discussão

Além de estar associada a fatores ambientais e genéticos, a heterogeneidade geográfica de doenças associadas ao EBV pode estar relacionadas à distribuição de genótipos do EBV nas populações humanas. Alguns genótipos virais podem apresentar propriedades biológicas diferentes sendo que alguns estudos buscaram identificar particularidades nas propriedades da oncoproteína viral LMP1 (Tsai Ming-Han et al. 2013). Apesar das diferenças estruturais identificadas na LMP1 de diferentes genótipos do EBV, aparentemente são mantidas as propriedades de transformação celular dessa oncoproteína, o que foi atribuído à preservação de seus domínios CTARs (Raab-Traub 2012). LMP1 apresenta habilidade para modular a morfologia de células epiteliais, motilidade e invasão celular, destacando o importante papel dessa proteína na transformação de células pelo EBV (Dawson, Port, and Young 2012; Tsao et al. 2002). Não obstante, acredita-se que as variantes de LMP1 possam contribuir para o grau de agressividade tumoral (Tsao et al. 2002).

Em cânceres de origem epitelial, admite-se que a agressividade biológica da doença pode ser favorecida pelo processo de EMT em virtude da aquisição de alterações moleculares e morfológicas na célula neoplásica que resultam em diminuição de adesão celular, aumento da motilidade e da capacidade de invasão, fenômenos que favorecem disseminação neoplásica e metástase (Ye and Weinberg 2015). Em última análise, a manifestação dessas propriedades decorre da expressão de genes reguladores da EMT que codificam os fatores transcricionais *SNAIL*, *SLUG*, *ZEB1* e *TWIST*, que em geral propiciam repressão de genes de fenótipo epitelial e aumento da expressão de genes associados ao fenótipo de células mesenquimais (Nieto et al. 2016).

O processo de EMT pode ser induzido por EBV LMP1 por meio do aumento da expressão de fatores transcricionais e ativação do ativador plasminogênico tipo uroquinase (*Urokinase-type plasminogen activator* - *uPA*). Como consequência, ocorre supressão de expressão de genes associados ao fenótipo epitelial simultâneo ao aumento da expressão de genes associados ao fenótipo mesenquimal e das taxas de motilidade e invasão celular. (M. A. Morris, Dawson, and Young 2009). Uma das características de EMT é a troca de caderinas a qual pode ser incentivada por LMP1 mediante aumento da expressão de DNA-metiltransferase, *SNAIL1*, *SNAIL2* e *TWIST*. Além da troca de expressão de caderinas que resulta na diminuição de adesão e aumento da motilidade celular, a ativação das vias de

sinalização do NFkB, PI3K/Akt e Rho por LMP1 incentivam o remodelamento do citoesqueleto e formação de filopódios (M. A. Morris, Dawson, and Young 2009; Toshiyuki Horikawa et al. 2007). Durante a migração, as células podem ter que lidar com a deflagração de morte celular por anoquise devido à falta de ancoragem. Entretanto, a expressão de LMP1 propicia subversão do mecanismo de anoquise por modulação do microambiente induzida pela ativação do TGF- β , que propicia aumento a expressão de fibronectina e seu receptor $\alpha 5 \beta 1$ (M. Morris, Young, and Dawson 2008; Wasil and Shair 2015).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a presença de LMP1 nas células provocam alterações relacionadas ao fenótipo maligno, mas revelam ausência de diferenças significativas entre as variantes B95.8 e M81 de LMP1 na expressão de genes associados à EMT. A expressão da LMP1 nas linhagens HEK293 e NP69 por transfecção transiente utilizando os vetores pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81 foi confirmada pela análise de expressão do gene *BNLF1* (Figura 10), imunodeteção (Figura 11) e análise funcional de LMP1 na linhagem HEK293 (Figura 12). Ambas as variantes B95.8 e M81 de LMP1 apresentaram aumento da capacidade de invasão e migração quando comparadas com o grupo controle (Figuras 15 e 16). De fato, já é descrito na literatura que LMP1 favorece o aumento de migração e invasão celular pela expressão de caderina-N e MMPs (Wasil and Shair 2015).

A expressão do gene *BNLF1* (codifica LMP1) identificado nos experimentos de qPCR (Figura 17) demonstra que a variante M81 apresenta maior taxa de expressão nas linhagens HEK293 e NP69 em relação a variante B95.8. Este dado está em conformidade com os achados recentemente publicados por Dheekollu e colaboradores, que demonstraram que a expressão dos transcritos de latência é alterada quando o gene *EBNA1* é suprimido, sendo a expressão de LMP1 M81 maior em relação a variante B95.8 (Dheekollu et al. 2017).

No presente estudo, os resultados de viabilidade celular sugerem que células expressando LMP1 M81 apresentaram maior efeito citopático em relação às que expressavam a variante B95.8 (Figura 13), efeito que foi notado para células NP69. Uma vez que a redução da viabilidade celular não esteve associada ao aumento da ativação de caspases 3 e 7 (Figura 14), é possível sugerir que o efeito citopático esteja associado à ativação de TRADD por LMP1, dado demonstrado por Brocqueville e colaboradores (Brocqueville et al. 2013). A ativação de TRADD pode causar a morte celular por diferentes

vias. TRADD pode migrar para o núcleo conduzindo a morte celular por associação a proteína de leucemia promielocítica (*Promyelocytic Leukemia Protein – PLD*). No entanto, quando no citoplasma TRADD pode ativar caspase 8 desencadeando ativação de caspase 3 (Morgan et al. 2002; Bender et al. 2005)

Células NP69 expressando qualquer das variantes estudadas de EBV LMP1 (B95.8 e M81) apresentaram aumento da expressão para *TWIST*, um potente indutor de características mesenquimais e pode ter contribuído para o aumento da expressão de genes associados ao fenótipo mesenquimal. Estudos previamente publicados demonstram que *TWIST* é induzido por EBV LMP1 por meio da ativação da via NFkB (Cabrera Je 2013; Nieto et al. 2016). O aumento da expressão de genes mesenquimais ocorre em sintonia com os achados de migração e invasão celular (Figuras 15 e 16), demonstrando a capacidade da LMP1 de ativar o processo de EMT. A expressão do gene *MMP9* foi significativamente maior nas células NP69 expressando as variantes LMP1 quando comparada com o grupo controle e cerca de doze vezes mais em relação à expressão de *MMP2* e demonstra que LMP1 modula a expressão de *MMP9* e não de *MMP2* (Yoshizaki et al. 1998).

No presente estudo, os genes que codificam produtos associados a características epiteliais mantiveram expressão equivalente ao observado no grupo controle. Entretanto, a troca de expressão entre caderinas previamente relatada na linhagem NP69 expressando LMP1 (Horikawa et al. 2011) não foi demonstrada no presente estudo devido a oscilações encontradas nas análises de expressão gênica para *CDH1* do grupo controle, as quais podem ter sido ocasionadas pela transfecção. Células HEK293 expressando LMP1 B95.8 apresentou expressão aumentada para o gene *TWIST* e *MMP9*. Demais genes avaliados para EMT não apresentaram alterações significativas. Os resultados obtidos devem ser interpretados à luz do reconhecimento das limitações impostas pelo modelo experimental adotado. Inicialmente buscou-se estabelecimento de linhagens celulares expressando de modo estável as variantes B95. 8 e M81 de EBV LMP1. Entretanto, a expressão da oncoproteína viral a partir dos construtos gerados proporcionou efeitos citopáticos que inviabilizaram a seleção de células estavelmente transfectadas.

Existem poucas linhagens EBV positivo validadas e dado à dificuldade na obtenção dessas linhagens optou-se por utilizar linhagens EBV negativo (HEK293/NP69) e constructos para as transfecções contendo as ORFs das variantes de LMP1. Em trabalho publicado em

2013, Brocqueville e colaboradores realizaram experimentos com constructo contendo a ORF de LMP1 e relataram que a expressão elevada da proteína LMP1 desencadeia uma “crise de citotoxicidade”, ao final da qual as células passam a expressar essa proteína de forma estável e adquirem novas características como resistência a apoptose e ativação de EMT (Brocqueville et al. 2013). Em estudo publicado em 2016, Verhoeven e colaboradores demonstraram que os níveis de LMP1 são controlados por mecanismo de autorregulação que envolve microRNAs (miRs) codificados na região BART (BamHI-A *rightward transcripts*) do genoma viral (Verhoeven et al. 2016). Durante o ciclo latente EBV expressa mais 40 microRNAs maduros associados a manutenção do ciclo latente, expressão de genes virais que atuam na regulação do ciclo lítico e expressão de genes associados a apoptose em células hospedeiras (Hooykaas et al. 2016; Zhu et al. 2013). Dois miRs da família dos BARTs são relatados como reguladores da expressão do gene que codifica LMP1 (*BNLF1*): EBV-miR-BART-9 EBV-miR-BART5-5p. Empregando a linhagem de linfoma NKTCL (*Natural Killer/T-cell lymphoma*), Ramakrishnan e colaboradores demonstraram que ao inibir EBV-miRBART-9 houve redução na expressão de *BNLF1*. Entretanto, ao retirarem o inibidor de EBV-miRBART-9 houve aumento na expressão de *BNLF1*. Verhoeven e colaboradores utilizaram as linhagens de carcinoma de nasofaringe C666 e carcinoma gástrico AGS-Bx1 e demonstraram que EBV-miR-BART5-5p regula negativamente a expressão de *BNLF1*. A indução de NFkB por LMP1 aumenta a expressão de EBV-miR-BART5-5p, resultando em mecanismo de autorregulação (Ramakrishnan et al. 2011; Verhoeven et al. 2016). Esses mecanismos responsáveis pela regulação da expressão da LMP1 estavam ausentes nos experimentos e corroboram o resultado para viabilidade celular (Figura 13) e o nível de expressão para o gene *BNLF1* (Figura 17).

7 Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

1. Células expressando as variantes EBVLMP1 B95.8 e M81 apresentam maior capacidade migratória e invasividade em relação a células transfectadas com o vetor base pZsGreen, mas sem diferença significativa;
2. Células transfectadas com a variante EBVLMP1 M81 apresentaram maior taxa de mortalidade celular, um indicativo que essas variantes comportam-se de maneira distinta;
3. Foi observado que LMP1 modula a expressão de alguns genes associado ao programa de EMT, mas não foram encontradas diferenças significativas quando comparado entre as células expressando as variantes EBVLMP1 B95.8 e M81.

Em síntese, conclui-se que células expressando as variantes EBVLMP1 B95.8 e M81 não apresentam diferenças significativas quanto a regulação do programa de EMT. Entretanto, a análise de viabilidade celular demonstra que as variantes de LMP1 podem se comportar de forma distinta.

8 Referência Bibliográfica

- Ahn, Young-Ho, Don L. Gibbons, Deepavali Chakravarti, Chad J. Creighton, Zain H. Rizvi, Henry P. Adams, Alexander Pertsemilidis, et al. 2012. "ZEB1 Drives Prometastatic Actin Cytoskeletal Remodeling by Downregulating miR-34a Expression." *Journal of Clinical Investigation* 122 (9): 3170–83.
- Ala-aho, Risto, and Veli-Matti Kähäri. 2005. "Collagenases in Cancer." *Biochimie* 87 (3–4): 273–86.
- Asahi-Ozaki, Yasuko, Yuko Sato, Takayuki Kanno, Tetsutaro Sata, and Harutaka Katano. 2006. "Quantitative Analysis of Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV) in KSHV-Associated Diseases." *Journal of Infectious Diseases* 193 (6): 773–782.
- Baer, R., A. T. Bankier, M. D. Biggin, P. L. Deininger, P. J. Farrell, T. J. Gibson, G. Hatfull, et al. 1984. "DNA Sequence and Expression of the B95-8 Epstein—Barr Virus Genome." *Nature* 310 (5974): 207–11.
- Balfour, Henry H, Samantha K Dunmire, and Kristin A Hogquist. 2015. "Infectious Mononucleosis." *Clinical & Translational Immunology* 4 (2): e33.
- Banyard, Jacqueline, and Diane R. Bielenberg. 2015. "The Role of EMT and MET in Cancer Dissemination." *Connective Tissue Research* 56 (5): 403–13.
- Bender, L. M., M. J. Morgan, L. R. Thomas, Z.-G. Liu, and A. Thorburn. 2005. "The Adaptor Protein TRADD Activates Distinct Mechanisms of Apoptosis from the Nucleus and the Cytoplasm." *Cell Death & Differentiation* 12 (5): 473–81.
- Berx, G., and F. van Roy. 2009. "Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (6): a003129–a003129.
- Bissell, Mina J, and William C Hines. 2011. "Why Don't We Get More Cancer? A Proposed Role of the Microenvironment in Restraining Cancer Progression." *Nature Medicine* 17 (3): 320–29.
- Bornkamm, G W, and W Hammerschmidt. 2001. "Molecular Virology of Epstein-Barr Virus." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B* 356 (1408): 437–59.
- Brabletz, Thomas. 2012. "EMT and MET in Metastasis: Where Are the Cancer Stem Cells?" *Cancer Cell* 22 (6): 699–701.
- Brocqueville, Guillaume, Papa Alioune Ndour, Tan-Sothéa Ouk, Arnaud Le Goff, Caroline De Witte, Alexandra Mougél, Jean Coll, Véronique Fafeur, Xuefen Le Bourhis, and Eric Adriaenssens. 2013. "LMP1-Induced Cell Death May Contribute to the Emergency of Its Oncogenic Property." Edited by Nai Sum Wong. *PLoS ONE* 8 (4): e60743.
- Burrows, Jacqueline M., Lindell Bromham, Megan Woolfit, Gwenaél Piganeau, Judy Tellam, Geoff Connolly, Natasha Webb, et al. 2004. "Selection Pressure-Driven Evolution of the Epstein-Barr Virus-Encoded Oncogene LMP1 in Virus Isolates from Southeast Asia." *Journal of Virology* 78 (13): 7131–37.
- Cabrera Je, Escobar. 2013. "The Role of Transcription Factor TWIST in Cancer Cells." *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy* 4 (1).
- Cao, Yang, Xiyong Liu, Wei Lu, Yuanyuan Chen, Xiangsong Wu, Maolan Li, Xu-an Wang, et al. 2015. "Fibronectin Promotes Cell Proliferation and Invasion through mTOR Signaling Pathway Activation in Gallbladder Cancer." *Cancer Letters* 360 (2): 141–50.

- Chan, Andrew Siu Chung, Ka Fai To, Kwok Wai Lo, Ko Fung Mak, Wai Pak, Brian Chiu, Gary M. K. Tse, et al. 2000. "High Frequency of Chromosome 3p Deletion in Histologically Normal Nasopharyngeal Epithelia from Southern Chinese." *Cancer Research* 60 (19): 5365–70.
- Chan, Sylvia Yat-Yee, Kwong-Wai Choy, Sai-Wah Tsao, Qian Tao, Tao Tang, Grace Tin-Yun Chung, and Kwok-Wai Lo. 2008. "Authentication of Nasopharyngeal Carcinoma Tumor Lines." *International Journal of Cancer* 122 (9): 2169–71.
- Chang, Cindy M., Kelly J. Yu, Sam M. Mbulaiteye, Allan Hildesheim, and Kishor Bhatia. 2009. "The Extent of Genetic Diversity of Epstein-Barr Virus and Its Geographic and Disease Patterns: A Need for Reappraisal." *Virus Research* 143 (2): 209–21.
- Chang, E. T., and H.-O. Adami. 2006. "The Enigmatic Epidemiology of Nasopharyngeal Carcinoma." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 15 (10): 1765–77.
- Chang, Lynne, and Robert D. Goldman. 2004. "Intermediate Filaments Mediate Cytoskeletal Crosstalk." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (8): 601–13.
- Chernoivanenko, I. S., An. A. Minin, and A. A. Minin. 2013. "Role of Vimentin in Cell Migration." *Russian Journal of Developmental Biology* 44 (3): 144–57.
- Chu, Yi-Wen, Elisabeth A. Seftor, Lewis H. Romer, and M. J. Hendrix. 1996. "Experimental Coexpression of Vimentin and Keratin Intermediate Filaments in Human Melanoma Cells Augments Motility." *The American Journal of Pathology* 148 (1): 63.
- Clarke, Emma J., and Viki Allan. 2002. "Intermediate Filaments: Vimentin Moves in." *Current Biology* 12 (17): R596–R598.
- Connolly, Sarah A., Julia O. Jackson, Theodore S. Jardetzky, and Richard Longnecker. 2011. "Fusing Structure and Function: A Structural View of the Herpesvirus Entry Machinery." *Nature Reviews Microbiology* 9 (5): 369–81.
- Davison, Andrew J. 2010. "Herpesvirus Systematics." *Veterinary Microbiology* 143 (1): 52–69.
- Davison, Andrew J., Richard Eberle, Bernhard Ehlers, Gary S. Hayward, Duncan J. McGeoch, Anthony C. Minson, Philip E. Pellett, Bernard Roizman, Michael J. Studdert, and Etienne Thiry. 2009. "The Order Herpesvirales." *Archives of Virology* 154 (1): 171–77.
- Dawson, Christopher W., Rebecca J. Port, and Lawrence S. Young. 2012. "The Role of the EBV-Encoded Latent Membrane Proteins LMP1 and LMP2 in the Pathogenesis of Nasopharyngeal Carcinoma (NPC)." *Seminars in Cancer Biology* 22 (2): 144–53.
- Desgranges, C., G. Lenoir, G. de-Thé, J. M. Seigneurin, J. Hilgers, and P. Dubouché. 1976. "In Vitro Transforming Activity of EBV. I-Establishment and Properties of Two EBV Strains (M81 and M72) Produced by Immortalized Callithrix Jacchus Lymphocytes." *Biomedicine / [Publiee Pour l'A.A.I.C.I.G.]* 25 (9): 349–52.
- Dheekollu, Jayaraju, Kimberly Malecka, Andreas Wiedmer, Henri-Jacques Delecluse, Alan K. S. Chiang, Dario C. Altieri, Troy E. Messick, et al. 2017. "Carcinoma-Risk Variant of EBNA1 Deregulates Epstein-Barr Virus Episomal Latency." *Oncotarget* 5 (0).
- Dimova, Ivanka, Georgi Popivanov, and Valentin Djonov. 2014. "Angiogenesis in Cancer- General Pathways and Their Therapeutic Implications." *Journal of BUON* 19 (1): 15–21.
- Eger, Andreas, and Wolfgang Mikulits. 2005. "Models of Epithelial–mesenchymal Transition." *Drug Discovery Today: Disease Models* 2 (1): 57–63.

- Elgui de Oliveira, Deilson, Bárbara G. Müller-Coan, and Joseph S. Pagano. 2016. "Viral Carcinogenesis Beyond Malignant Transformation: EBV in the Progression of Human Cancers." *Trends in Microbiology* 24 (8): 649–64.
- Eliopoulos, Aristides G, and Lawrence S Young. 2001. "LMP1 Structure and Signal Transduction." *Seminars in Cancer Biology* 11 (6): 435–44.
- Epstein, M. A., G. Henle, B. G. Achong, and Y. M. Barr. 1965. "Morphological and Biological Studies on a Virus in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma." *The Journal of Experimental Medicine* 121 (5): 761–770.
- Feederle, R., B. Neuhierl, G. Baldwin, H. Bannert, B. Hub, J. Mautner, U. Behrends, and H. J. Delecluse. 2006. "Epstein-Barr Virus BNRF1 Protein Allows Efficient Transfer from the Endosomal Compartment to the Nucleus of Primary B Lymphocytes." *Journal of Virology* 80 (19): 9435–43.
- Ferlay, Jacques, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman, and Freddie Bray. 2015. "Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012." *International Journal of Cancer* 136 (5): E359–86.
- Fielding, C. A., K. Sandvej, A. Mehl, P. Brennan, M. Jones, and M. Rowe. 2001. "Epstein-Barr Virus LMP-1 Natural Sequence Variants Differ in Their Potential To Activate Cellular Signaling Pathways." *Journal of Virology* 75 (19): 9129–41.
- Fortier, Anne-Marie, Eric Asselin, and Monique Cadrin. 2013. "Keratin 8 and 18 Loss in Epithelial Cancer Cells Increases Collective Cell Migration and Cisplatin Sensitivity through Claudin1 Up-Regulation." *Journal of Biological Chemistry* 288 (16): 11555–71.
- Fortier, Anne-Marie, Céline Van Themsche, Éric Asselin, and Monique Cadrin. 2010. "Akt Isoforms Regulate Intermediate Filament Protein Levels in Epithelial Carcinoma Cells." *FEBS Letters* 584 (5): 984–88.
- Francescone, Ralph, Vivianity Hou, and Sergei I. Grivennikov. 2014. "Microbiome, Inflammation and Cancer." *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)* 20 (3): 181–89.
- Fried, Bernard, Aditya Reddy, and David Mayer. 2011. "Helminths in Human Carcinogenesis." *Cancer Letters* 305 (2): 239–49.
- Gonzalez, David M., and Damian Medici. 2014. "Signaling Mechanisms of the Epithelial-Mesenchymal Transition." *Science Signaling* 7 (344): re8.
- Gonzalez-Mariscal, Lorenza, Jael Miranda, Jose Mario Ortega-Olvera, Helios Gallego-Gutierrez, Arturo Raya-Sandino, and Orlando Vargas-Sierra. 2016. "Zonula Occludens Proteins in Cancer." *Current Pathobiology Reports* 4 (3): 107–16.
- Goodwin, Marita, and others. 2004. "Classical Cadherin Adhesion Molecules: Coordinating Cell Adhesion, Signaling and the Cytoskeleton." *Journal of Molecular Histology* 35 (8–9): 839–844.
- Görzer, Irene, Hubert G. M. Niesters, Jan J. Cornelissen, and Elisabeth Puchhammer-Stöckl. 2006. "Characterization of Epstein-Barr Virus Type I Variants Based on Linked Polymorphism among EBNA3A, -3B, and -3C Genes." *Virus Research* 118 (1–2): 105–14.
- Gras, Baptiste, Laurent Jacqueroud, Anne Wierinckx, Christelle Lamblot, Frédérique Fauvet, Joël Lachuer, Alain Puisieux, and Stéphane Ansieau. 2014. "Snail Family Members

- Unequally Trigger EMT and Thereby Differ in Their Ability to Promote the Neoplastic Transformation of Mammary Epithelial Cells." *PLoS ONE* 9 (3).
- Hajdu, Steven I. 2011. "A Note from History: Landmarks in History of Cancer, Part 1." *Cancer* 117 (5): 1097–1102.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74.
- Henry Pitot. 1989. "Progression: The Terminal Stage in Carcinogenesis." *Japanese Journal of Cancer Research* 80 (7): 599–607.
- Hildesheim, Allan, and Cheng-Ping Wang. 2012. "Genetic Predisposition Factors and Nasopharyngeal Carcinoma Risk: A Review of Epidemiological Association Studies, 2000–2011." *Seminars in Cancer Biology* 22 (2): 107–16.
- Hlatky, L., and P. Hahnfeldt. 2014. "Beyond the Cancer Cell: Progression-Level Determinants Highlight the Multiscale Nature of Carcinogenesis Risk." *Cancer Research* 74 (3): 659–64.
- Hooykaas, Marjolein J. G., Elisabeth Kruse, Emmanuel J. H. J. Wiertz, and Robert Jan Lebbink. 2016. "Comprehensive Profiling of Functional Epstein-Barr Virus miRNA Expression in Human Cell Lines." *BMC Genomics* 17 (August).
- Horikawa, T., J. Yang, S. Kondo, T. Yoshizaki, I. Joab, M. Furukawa, and J. S. Pagano. 2007. "Twist and Epithelial-Mesenchymal Transition Are Induced by the EBV Oncoprotein Latent Membrane Protein 1 and Are Associated with Metastatic Nasopharyngeal Carcinoma." *Cancer Research* 67 (5): 1970–78. d
- Horikawa, T, T Yoshizaki, S Kondo, M Furukawa, Y Kaizaki, and J S Pagano. 2011. "Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Snail and Epithelial-mesenchymal Transition in Metastatic Nasopharyngeal Carcinoma." *British Journal of Cancer* 104 (7): 1160–67.
- Horikawa, Toshiyuki, Jing Yang, Satoru Kondo, Tomokazu Yoshizaki, Irene Joab, Mitsuru Furukawa, and Joseph S. Pagano. 2007. "Twist and Epithelial-Mesenchymal Transition Are Induced by the EBV Oncoprotein Latent Membrane Protein 1 and Are Associated with Metastatic Nasopharyngeal Carcinoma." *Cancer Research* 67 (5): 1970–78.
- Houldcroft, Charlotte J, and Paul Kellam. 2015. "Host Genetics of Epstein-Barr Virus Infection, Latency and Disease." *Reviews in Medical Virology* 25 (2): 71–84.
- Hu, Qi-Ping, Jing-Ya Kuang, Qing-Kai Yang, Xiu-Wu Bian, and Shi-Cang Yu. 2015. "Beyond a Tumor Suppressor: Soluble E-Cadherin Promotes the Progression of Cancer." *International Journal of Cancer*, December, n/a-n/a.
- Hunter, K W. 2004. "Host Genetics and Tumour Metastasis." *British Journal of Cancer* 90 (4): 752–55.
- Hutt-Fletcher, Lindsey M. 2007. "Epstein-Barr Virus Entry." *Journal of Virology* 81 (15): 7825–32.
- Huveneers, S., H. Truong, R. Fassler, A. Sonnenberg, and E. H. J. Danen. 2008. "Binding of Soluble Fibronectin to Integrin $\alpha 5 \beta 1$ - Link to Focal Adhesion Redistribution and Contractile Shape." *Journal of Cell Science* 121 (15): 2452–62. Hyndman, Iain Joseph. 2016. "Review: The Contribution of Both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours." *Cancer Microenvironment* 9 (1): 63–69.

- IARC, International Agency for Research on Cancer. 1997. *Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8: This Publication Represents the Views and Expert Opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Which Met in Lyon, 17 - 24 June 1997*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 70. Lyon: IARC.
- Instituto Nacional do Câncer - INCA. 2015. "Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil."
- Ivaska, Johanna. 2011. "Vimentin: Central Hub in EMT Induction?" *Small GTPases* 2 (1): 51–53.
- Jacob, Francis, Rea Guertler, Stephanie Naim, Sheri Nixdorf, André Fedier, Neville F. Hacker, and Viola Heinzelmann-Schwarz. 2013. "Careful Selection of Reference Genes Is Required for Reliable Performance of RT-qPCR in Human Normal and Cancer Cell Lines." Edited by Sui Huang. *PLoS ONE* 8 (3): e59180.
- Jeanes, A, C J Gottardi, and A S Yap. 2008. "Cadherins and Cancer: How Does Cadherin Dysfunction Promote Tumor Progression?" *Oncogene* 27 (55): 6920–29.
- Jezierska, Agnieszka, and Tomasz Motyl. 2009. "Matrix Metalloproteinase-2 Involvement in Breast Cancer Progression: A Mini-Review." *Medical Science Monitor Basic Research* 15 (2): RA32–RA40.
- Jiménez-Salazar, Javier E., Pedro Posadas-Rodríguez, Roberto C. Lazzarini-Lechuga, Armando Luna-López, Alejandro Zentella-Dehesa, Luis E. Gómez-Quiroz, Mina Königsberg, Guadalupe Domínguez-Gómez, and Pablo Damián-Matsumura. 2014. "Membrane-Initiated Estradiol Signaling of Epithelial-Mesenchymal Transition-Associated Mechanisms Through Regulation of Tight Junctions in Human Breast Cancer Cells." *Hormones and Cancer* 5 (3): 161–73.
- Kalluri, Raghu, and Robert A. Weinberg. 2009. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420–28.
- Kang, Myung-Soo, and Elliott Kieff. 2015. "Epstein–Barr Virus Latent Genes." *Experimental & Molecular Medicine* 47 (1): e131.
- Karantza, V. 2011. "Keratins in Health and Cancer: More than Mere Epithelial Cell Markers." *Oncogene* 30 (2): 127–38.
- Kelly, Barbara J., Cornel Fraefel, Anthony L. Cunningham, and Russell J. Diefenbach. 2009. "Functional Roles of the Tegument Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1." *Virus Research* 145 (2): 173–86.
- Lam, Ngan, and Bill Sugden. 2003. "CD40 and Its Viral Mimic, LMP1: Similar Means to Different Ends." *Cellular Signalling* 15 (1): 9–16.
- Lamouille, Samy, Jian Xu, and Rik Derynck. 2014. "Molecular Mechanisms of Epithelial–mesenchymal Transition." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (3): 178–96.
- Lee, D. Y., and B. Sugden. 2008. "The Latent Membrane Protein 1 Oncogene Modifies B-Cell Physiology by Regulating Autophagy." *Oncogene* 27 (20): 2833–2842.
- Li, Hsin-Pai, and Yu-Sun Chang. 2003. "Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1: Structure and Functions." *Journal of Biomedical Science* 10 (5): 490–504.
- Li, Xin, Ross Fasano, Ena Wang, Kai-Tai Yao, and Francesco M. Marincola. 2009. "HLA Associations with Nasopharyngeal Carcinoma." *Current Molecular Medicine* 9 (6): 751–65.

- Liao, John B. 2006. "Cancer Issue: Viruses and Human Cancer." *The Yale Journal of Biology and Medicine* 79 (3–4): 115.
- Lieberman, Paul M. 2013. "Keeping It Quiet: Chromatin Control of Gammaherpesvirus Latency." *Nature Reviews Microbiology* 11 (12): 863–75.
- Lin, Jiaying, Xishi Liu, and Ding Ding. 2015. "Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Stem-like Cells Derived from Carcinoma Cell Lines of the Cervix Uteri." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (1): 847.
- Liu, Gang, Arnaud Friggeri, Yanping Yang, Jadranka Milosevic, Qiang Ding, Victor J. Thannickal, Naftali Kaminski, and Edward Abraham. 2010. "miR-21 Mediates Fibrogenic Activation of Pulmonary Fibroblasts and Lung Fibrosis." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (8): 1589–97.
- Liu, Yongqing, Shahenda El-Naggar, Douglas S. Darling, Yujiro Higashi, and Douglas C. Dean. 2008. "Zeb1 Links Epithelial-Mesenchymal Transition and Cellular Senescence." *Development* 135 (3): 579–588.
- Liu, Zhen, Lixia Li, Zhixiong Yang, Weiren Luo, Xin Li, Huiling Yang, Kaitai Yao, Bin Wu, and Weiye Fang. 2010. "Increased Expression of MMP9 Is Correlated with Poor Prognosis of Nasopharyngeal Carcinoma." *BMC Cancer* 10 (1): 1.
- Lo, Angela Kwok Fung, Dolly P. Huang, Kwok Wai Lo, Yiu Loon Chui, Hoi Ming Li, Jesse Chung Sean Pang, and Sai-Wah Tsao. 2004. "Phenotypic Alterations Induced by the Hong Kong-Prevalent Epstein-Barr Virus-Encoded LMP1 Variant (2117-LMP1) in Nasopharyngeal Epithelial Cells." *International Journal of Cancer* 109 (6): 919–25.
- Lo, Angela Kwok Fung, Yu Liu, Xiang Hong Wang, Dolly P Huang, Po Wing Yuen, Yong Chuan Wong, and George Sai Wah Tsao. 2003. "Alterations of Biologic Properties and Gene Expression in Nasopharyngeal Epithelial Cells by the Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Protein 1." *Laboratory Investigation* 83 (5): 697–709.
- Ma, Lei, Xubin Deng, Minhua Wu, Gong Zhang, and Jianqing Huang. 2014. "Down-Regulation of miRNA-204 by LMP-1 Enhances CDC42 Activity and Facilitates Invasion of EBV-Associated Nasopharyngeal Carcinoma Cells." *FEBS Letters* 588 (9): 1562–70.
- Ma, Li-Jung, Sung-Wei Lee, Li-Ching Lin, Tzu-Ju Chen, I-Wei Chang, Han-Ping Hsu, Kwang-Yu Chang, Hsuan-Ying Huang, and Chien-Feng Li. 2014. "Fibronectin Overexpression Is Associated with Latent Membrane Protein 1 Expression and Has Independent Prognostic Value for Nasopharyngeal Carcinoma." *Tumor Biology* 35 (2): 1703–12.
- Mainou, B. A., and N. Raab-Traub. 2006. "LMP1 Strain Variants: Biological and Molecular Properties." *Journal of Virology* 80 (13): 6458–68.
- McLaughlin-Drubin, Margaret E., and Karl Munger. 2008. "Viruses Associated with Human Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1782 (3): 127–50.
- Mei, Yu-Ping, Xiao-Feng Zhu, Jun-Min Zhou, He Huang, Rong Deng, and Yi-Xin Zeng. 2006. "siRNA Targeting LMP1-Induced Apoptosis in EBV-Positive Lymphoma Cells Is Associated with Inhibition of Telomerase Activity and Expression." *Cancer Letters* 232 (2): 189–98.
- Mendez, M. G., S. I. Kojima, and R. D. Goldman. 2010. "Vimentin Induces Changes in Cell Shape, Motility, and Adhesion during the Epithelial to Mesenchymal Transition." *The FASEB Journal* 24 (6): 1838–51.

- Miller, I. George, and Ayman El-Guindy. 2002. "Regulation of Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Activation in Malignant and Nonmalignant Disease." *Journal of the National Cancer Institute* 94 (23): 1733–1735.
- Miller, William E., Rachel Hood Edwards, Dennis M. Walling, and Nancy Raab-Traub. 1994. "Sequence Variation in the Epstein—Barr Virus Latent Membrane Protein 1." *Journal of General Virology* 75 (10): 2729–40.
- Mimi, C. Yu, and Jian-Min Yuan. 2002. "Epidemiology of Nasopharyngeal Carcinoma." In *Seminars in Cancer Biology*, 12:421–429.
- Miyamoto, Shingo, BEN-ZION KATHZ, Robert M. Lafrenie, and Kenneth M. Yamada. 1998. "Fibronectin and Integrins in Cell Adhesion, Signaling, and Morphogenesis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 857 (1): 119–129.
- Moll, Roland, Markus Divo, and Lutz Langbein. 2008. "The Human Keratins: Biology and Pathology." *Histochemistry and Cell Biology* 129 (6): 705.
- Morgan, Michael, Jacqueline Thorburn, Pier Paolo Pandolfi, and Andrew Thorburn. 2002. "Nuclear and Cytoplasmic Shuttling of TRADD Induces Apoptosis via Different Mechanisms." *The Journal of Cell Biology* 157 (6): 975–84.
- Morris, M, L Young, and C Dawson. 2008. "DNA Tumour Viruses Promote Tumour Cell Invasion and Metastasis by Deregulating the Normal Processes of Cell Adhesion and Motility." *European Journal of Cell Biology* 87 (8–9): 677–97.
- Morris, Mhairi A., Christopher W. Dawson, Louise Laverick, Alexandra M. Davis, Joe P. R. Dudman, Sathuwarman Raveenthiraraj, Zeeshan Ahmad, Lee-Fah Yap, and Lawrence S. Young. 2016. "The Epstein-Barr Virus Encoded LMP1 Oncoprotein Modulates Cell Adhesion via Regulation of Activin A/TGF β and β 1 Integrin Signalling." *Scientific Reports* 6 (January): 19533.
- Morris, Mhairi A., Christopher W. Dawson, and Lawrence S. Young. 2009. "Role of the Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Protein-1, LMP1, in the Pathogenesis of Nasopharyngeal Carcinoma." *Future Oncology (London, England)* 5 (6): 811–25.
- Moserle, L., and O. Casanovas. 2013. "Anti-Angiogenesis and Metastasis: A Tumour and Stromal Cell Alliance." *Journal of Internal Medicine* 273 (2): 128–37.
- Müller-Coan, Bárbara G. 2016. "Efeitos da oncoproteína LMP1 do Vírus de Epstein-Barr no Potencial de Invasão e na Expressão de microRNAs Endógenos em Células Humanas in vitro. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)." Instituto de Biociências, Unesp Botucatu. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada).
- Münz, Christian, ed. 2015. In *Epstein Barr Virus Volume 1*. Vol. 390. Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing.
- Murray, Paul G., and Lawrence S. Young. 2001. "Epstein—Barr Virus Infection: Basis of Malignancy and Potential for Therapy." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 3 (28): 1–20.
- Ni, Chao, Yuhui Chen, Musheng Zeng, Rongjuan Pei, Yong Du, Linquan Tang, Mengyi Wang, et al. 2015. "In-Cell Infection: A Novel Pathway for Epstein-Barr Virus Infection Mediated by Cell-in-Cell Structures." *Cell Research* 25 (7): 785–800.
- Nieto, M. Angela, Ruby Yun-Ju Huang, Rebecca A. Jackson, and Jean Paul Thiery. 2016. "EMT: 2016." *Cell* 166 (1): 21–45.

- Nollet, Friedel, Patrick Kools, and Frans van Roy. 2000. "Phylogenetic Analysis of the Cadherin Superfamily Allows Identification of Six Major Subfamilies besides Several Solitary Members." *Journal of Molecular Biology* 299 (3): 551–72.
- Oriolo, Andrea S., Flavia A. Wald, Victoria P. Ramsauer, and Pedro J. I. Salas. 2007. "Intermediate Filaments: A Role in Epithelial Polarity." *Experimental Cell Research*, Special Issue - Intermediate Filaments, 313 (10): 2255–64.
- Palser, Anne L., Nicholas E. Grayson, Robert E. White, Craig Corton, Samantha Correia, Mohammed M. Ba abdullah, Simon J. Watson, et al. 2015. "Genome Diversity of Epstein-Barr Virus from Multiple Tumor Types and Normal Infection." Edited by R. M. Longnecker. *Journal of Virology* 89 (10): 5222–37.
- Peinado, Héctor, David Olmeda, and Amparo Cano. 2007. "Snail, Zeb and bHLH Factors in Tumour Progression: An Alliance against the Epithelial Phenotype?" *Nature Reviews Cancer* 7 (6): 415–28. doi:10.1038/nrc2131.
- Polk, D. Brent, and Richard M. Peek. 2010. "Helicobacter Pylori: Gastric Cancer and beyond." *Nature Reviews. Cancer* 10 (6): 403–14.
- Postigo, Antonio A., and Douglas C. Dean. 1999. "ZEB Represses Transcription through Interaction with the Corepressor CtBP." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (12): 6683–88.
- Potts, Jennifer R., and Iain D. Campbell. 1994. "Fibronectin Structure and Assembly." *Current Opinion in Cell Biology* 6 (5): 648–655.
- Raab-Traub, Nancy. 2012. "Novel Mechanisms of EBV-Induced Oncogenesis." *Current Opinion in Virology* 2 (4): 453–58.
- Radisky, Evette S., and Derek C. Radisky. 2010. "Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15 (2): 201–12.
- Ramakrishnan, Rajesh, Hart Donahue, David Garcia, Jie Tan, Norio Shimizu, Andrew P. Rice, and Paul D. Ling. 2011. "Epstein-Barr Virus BART9 miRNA Modulates LMP1 Levels and Affects Growth Rate of Nasal NK T Cell Lymphomas." *PLOS ONE* 6 (11): e27271.
- Rastelli, Julia, Cornelia Hömig-Hölzel, Jane Seagal, Werner Müller, Andrea C. Hermann, Klaus Rajewsky, and Ursula Zimmer-Strobl. 2008. "LMP1 Signaling Can Replace CD40 Signaling in B Cells in Vivo and Has Unique Features of Inducing Class-Switch Recombination to IgG1." *Blood* 111 (3): 1448–1455.
- Razak, Albiruni R.A., Lillian L. Siu, Fei-Fei Liu, Emma Ito, Brian O'Sullivan, and Kelvin Chan. 2010. "Nasopharyngeal Carcinoma: The next Challenges." *European Journal of Cancer* 46 (11): 1967–78.
- Reusch, Jessica A., Dhananjay M. Nawandar, Kenneth L. Wright, Shannon C. Kenney, and Janet E. Mertz. 2015. "Cellular Differentiation Regulator BLIMP1 Induces Epstein-Barr Virus Lytic Reactivation in Epithelial and B Cells by Activating Transcription from Both the R and Z Promoters." Edited by L. M. Hutt-Fletcher. *Journal of Virology* 89 (3): 1731–43.
- Rickinson, A. B., L. S. Young, and M. Rowe. 1987. "Influence of the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen EBNA 2 on the Growth Phenotype of Virus-Transformed B Cells." *Journal of Virology* 61 (5): 1310–17.

- Rickinson, A.B. 2014. "Co-Infections, Inflammation and Oncogenesis: Future Directions for EBV Research." *Seminars in Cancer Biology* 26 (June): 99–115.
- Roy, F. van, and G. Berx. 2008. "The Cell-Cell Adhesion Molecule E-Cadherin." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (23): 3756–88.
- Runkle, E. Aaron, and David Mu. 2013. "Tight Junction Proteins: From Barrier to Tumorigenesis." *Cancer Letters* 337 (1): 41–48.
- Safranek, J., M. Pesta, L. Holubec, V. Kulda, J. Dreslerova, J. Vrzalova, O. Topolcan, M. Pesek, J. Finek, and V. Treska. 2009. "Expression of MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA in Lung Tissue of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) and Benign Pulmonary Disease." *Anticancer Research* 29 (7): 2513–17.
- Satelli, Arun, and Shulin Li. 2011. "Vimentin as a Potential Molecular Target in Cancer Therapy Or Vimentin, an Overview and Its Potential as a Molecular Target for Cancer Therapy." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 68 (18): 3033–46.
- Satpathy, M., M. Shao, R. Emerson, D. B. Donner, and D. Matei. 2009. "Tissue Transglutaminase Regulates Matrix Metalloproteinase-2 in Ovarian Cancer by Modulating cAMP-Response Element-Binding Protein Activity." *Journal of Biological Chemistry* 284 (23): 15390–99.
- Scanlon, C. S., E. A. Van Tubergen, R. C. Inglehart, and N. J. D'Silva. 2013. "Biomarkers of Epithelial-Mesenchymal Transition in Squamous Cell Carcinoma." *Journal of Dental Research* 92 (2): 114–21.
- Schroeder, Andreas, Odilo Mueller, Susanne Stocker, Ruediger Salowsky, Michael Leiber, Marcus Gassmann, Samar Lightfoot, Wolfram Menzel, Martin Granzow, and Thomas Ragg. 2006. "The RIN: An RNA Integrity Number for Assigning Integrity Values to RNA Measurements." *BMC Molecular Biology* 7 (January): 3.
- Schweizer, Jürgen, Paul E. Bowden, Pierre A. Coulombe, Lutz Langbein, E. Birgitte Lane, Thomas M. Magin, Lois Maltais, et al. 2006. "New Consensus Nomenclature for Mammalian Keratins." *J Cell Biol* 174 (2): 169–74.
- Shair, K. H.Y, C. I. Schnegg, and N. Raab-Traub. 2009. "Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein-1 Effects on Junctional Plakoglobin and Induction of a Cadherin Switch." *Cancer Research* 69 (14): 5734–42.
- Shannon-Lowe, Claire, and Martin Rowe. 2011. "Epstein-Barr Virus Infection of Polarized Epithelial Cells via the Basolateral Surface by Memory B Cell-Mediated Transfer Infection." *PLoS Pathogens* 7 (5).
- Shumilov, Anatoliy, Ming-Han Tsai, Yvonne T. Schlosser, Anne-Sophie Kratz, Katharina Bernhardt, Susanne Fink, Tuba Mizani, et al. 2017. "Epstein–Barr Virus Particles Induce Centrosome Amplification and Chromosomal Instability." *Nature Communications* 8 (February): 14257.
- Singh, Purva, Cara Carraher, and Jean E. Schwarzbauer. 2010. "Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26 (1): 397–419.
- Sun, Wei, Dong-Bo Liu, Wen-Wen Li, Lin-Li Zhang, Guo-Xian Long, Jun-Feng Wang, Qi Mei, and Guo-Qing Hu. 2014. "Interleukin-6 Promotes the Migration and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines and Upregulates the Expression of MMP-2 and MMP-9." *International Journal of Oncology*, March.

- Svec, David, Ales Tichopad, Vendula Novosadova, Michael W. Pfaffl, and Mikael Kubista. 2015. "How Good Is a PCR Efficiency Estimate: Recommendations for Precise and Robust qPCR Efficiency Assessments." *Biomolecular Detection and Quantification* 3 (March): 9–16.
- Thiery, Jean Paul. 2002. "Epithelial–mesenchymal Transitions in Tumour Progression." *Nature Reviews Cancer* 2 (6): 442–54.
- Thompson, Lester D. R. 2007. "Update on Nasopharyngeal Carcinoma." *Head and Neck Pathology* 1 (1): 81–86.
- Thompson, Matthew P., and Razelle Kurzrock. 2004. "Epstein-Barr Virus and Cancer." *Clinical Cancer Research* 10 (3): 803–821.
- Tomlinson, Ian, Peter Sasieni, and Walter Bodmer. 2002. "How Many Mutations in a Cancer?" *The American Journal of Pathology* 160 (3): 755–758.
- Tsai, Chia-Lung, Hsin-Pai Li, Yen-Jung Lu, Chuen Hsueh, Ying Liang, Chi-Long Chen, Sai Wah Tsao, Ka-Po Tse, Jau-Song Yu, and Yu-Sun Chang. 2006. "Activation of DNA Methyltransferase 1 by EBV LMP1 Involves c-Jun NH2-Terminal Kinase Signaling." *Cancer Research* 66 (24): 11668–76.
- Tsai Ming-Han, Ana Raykova, Olaf Klinke, Katharina Bernhardt, Kathrin Gärtner, Carol S. Leung, Karsten Geletneky, et al. 2013. "Spontaneous Lytic Replication and Epitheliotropism Define an Epstein-Barr Virus Strain Found in Carcinomas." *Cell Reports* 5 (2): 458–70.
- Tsao, Sai Wah, Giorgos Tramoutanis, Christopher W. Dawson, Angela KF Lo, and Dolly P. Huang. 2002. "The Significance of LMP1 Expression in Nasopharyngeal Carcinoma." In *Seminars in Cancer Biology*, 12:473–487. Elsevier.
- Uemori, Takashi, Kiyozo Asada, Ikunoshin Kato, and Ryô Harasawa. 1992. "Amplification of the 16S-23S Spacer Region in rRNA Operons of Mycoplasmas by the Polymerase Chain Reaction." *Systematic and Applied Microbiology* 15 (2): 181–86.
- Verhoeven, Rob J. A., Shuang Tong, Gaohong Zhang, Jingfeng Zong, Yixin Chen, Dong-Yan Jin, Mei-Ru Chen, Jianji Pan, and Honglin Chen. 2016. "NF- κ B Signaling Regulates Expression of Epstein-Barr Virus BART MicroRNAs and Long Noncoding RNAs in Nasopharyngeal Carcinoma." Edited by J. U. Jung. *Journal of Virology* 90 (14): 6475–88.
- Vineis, Paolo, and Christopher P. Wild. 2014. "Global Cancer Patterns: Causes and Prevention." *The Lancet* 383 (9916): 549–557.
- Wallerand, Hervé, Grégoire Robert, Gilles Pasticier, Alain Ravaud, Philippe Ballanger, Robert E. Reiter, and Jean-Marie Ferrière. 2010. "The Epithelial-Mesenchymal Transition-Inducing Factor TWIST Is an Attractive Target in Advanced And/or Metastatic Bladder and Prostate Cancers." *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, Proceedings of the 2009 Society of Urologic Oncology Annual Spring Meeting, 28 (5): 473–79.
- Wang, David, David Liebowitz, and Elliott Kieff. 1985. "An EBV Membrane Protein Expressed in Immortalized Lymphocytes Transforms Established Rodent Cells." *Cell* 43 (December).
- Wang, Miao, Feng Zhao, Shujing Li, Alan K. Chang, Zhaojun Jia, Yixuan Chen, Feihong Xu, Hongming Pan, and Huijian Wu. 2013. "AIB1 Cooperates with ER α to Promote

- Epithelial Mesenchymal Transition in Breast Cancer through SNAI1 Activation." Edited by Rolf Müller. *PLoS ONE* 8 (6): e65556.
- Wang, Yifan, Jian Shi, Kequn Chai, Xuhua Ying, and Binhua P. Zhou. 2013. "The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis." *Current Cancer Drug Targets* 13 (9): 963.
- Ward, Mary H., Wen-Harn Pan, Yu-Juen Cheng, Feng-Hui Li, Louise A. Brinton, Chien-Jen Chen, Mow-Ming Hsu, et al. 2000. "Dietary Exposure to Nitrite and Nitrosamines and Risk of Nasopharyngeal Carcinoma in Taiwan." *International Journal of Cancer* 86 (5): 603–9.
- Wasil, L R, and K H Y Shair. 2015. "Epstein–Barr Virus LMP1 Induces Focal Adhesions and Epithelial Cell Migration through Effects on Integrin- α 5 and N-Cadherin." *Oncogenesis* 4 (10): e171.
- Wei, William I., and Jonathan ST Sham. 2005. "Nasopharyngeal Carcinoma." *The Lancet* 365 (9476): 2041–2054.
- Wheelock, M. J., Y. Shintani, M. Maeda, Y. Fukumoto, and K. R. Johnson. 2008. "Cadherin Switching." *Journal of Cell Science* 121 (6): 727–35.
- Xiong, Hua, Jie Hong, Wan Du, Yan-wei Lin, Lin-lin Ren, Ying-chao Wang, Wen-yu Su, et al. 2012. "Roles of STAT3 and ZEB1 Proteins in E-Cadherin Down-Regulation and Human Colorectal Cancer Epithelial-Mesenchymal Transition." *Journal of Biological Chemistry* 287 (8): 5819–32.
- Yamaguchi, Hideki, Jeffrey Wyckoff, and John Condeelis. 2005. "Cell Migration in Tumors." *Current Opinion in Cell Biology* 17 (5): 559–64.
- Yao, Q. Y., R. J. Tierney, D. Croom-Carter, D. Dukers, G. M. Cooper, C. J. Ellis, M. Rowe, and A. B. Rickinson. 1996. "Frequency of Multiple Epstein-Barr Virus Infections in T-Cell-Immunocompromised Individuals." *Journal of Virology* 70 (8): 4884–4894.
- Yates, John L. 1996. "Epstein-Barr Virus DNA Replication." *DNA Replication in Eukaryotic Cells*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 751–773.
- Yates, John L., Sarah M. Camiolo, and Jacqueline M. Bashaw. 2000. "The Minimal Replicator of Epstein-Barr VirusoriP." *Journal of Virology* 74 (10): 4512–4522.
- Ye, Xin, and Robert A. Weinberg. 2015. "Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression." *Trends in Cell Biology* 25 (11): 675–86.
- Yin, Bo, Mo Zhang, Yu Zeng, Youqiang Li, Chao Zhang, and Yongsheng Song. 2016. "Downregulation of Cytokeratin 18 Is Associated with Paclitaxel-resistance and Tumor Aggressiveness in Prostate Cancer." *International Journal of Oncology*, February.
- Yin, G, R Chen, A B Alvero, H-H Fu, J Holmberg, C Glackin, T Rutherford, and G Mor. 2010. "TWISTing Stemness, Inflammation and Proliferation of Epithelial Ovarian Cancer Cells through MIR199A2/214." *Oncogene* 29 (24): 3545–53.
- Yokota, Jun. 1999. "Tumor progression and metastasis." *Carcinogenesis* 21 (3): 497–503. doi:10.1093/carcin/21.3.497.
- Yoshizaki, Tomokazu, Hiroshi Sato, Mitsuru Furukawa, and Joseph S. Pagano. 1998. "The Expression of Matrix Metalloproteinase 9 Is Enhanced by Epstein–Barr Virus Latent Membrane Protein 1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (7): 3621–3626.

- Young, Lawrence S., and Alan B. Rickinson. 2004. "Epstein–Barr Virus: 40 Years on." *Nature Reviews Cancer* 4 (10): 757–68.
- Young, Lawrence S., Lee Fah Yap, and Paul G. Murray. 2016. "Epstein-Barr Virus: More than 50 Years Old and Still Providing Surprises." *Nature Reviews Cancer*.
- Yu, Kwok Hung, Sing Fai Leung, Stewart Yuk Tung, Benny Zee, Daniel T. T. Chua, Wai Man Sze, Stephen C. K. Law, et al. 2005. "Survival Outcome of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma with First Local Failure: A Study by the Hong Kong Nasopharyngeal Carcinoma Study Group." *Head & Neck* 27 (5): 397–405.
- Yu, Mimi C., and Jian-Min Yuan. 2002. "Epidemiology of Nasopharyngeal Carcinoma." *Seminars in Cancer Biology* 12 (6): 421–29.
- Zhang, Peijing, Yutong Sun, and Li Ma. 2015. "ZEB1: At the Crossroads of Epithelial-Mesenchymal Transition, Metastasis and Therapy Resistance." *Cell Cycle* 14 (4): 481–87.
- Zhu, Ying, Irina Haecker, Yajie Yang, Shou-Jiang Gao, and Rolf Renne. 2013. "Gamma-Herpesvirus-Encoded miRNAs and Their Roles in Viral Biology and Pathogenesis." *Current Opinion in Virology* 3 (3).
- Zhuravel, O. V., O. L. Gerashchenko, M. R. Khetsuriani, M. A. Soldatkina, and P. V. Pogrebnoy. 2014. "Expression of Human Beta-Defensins-1–4 in Thyroid Cancer Cells and New Insight on Biologic Activity of hBD-2 in Vitro." *Experimental Oncology*, no. 36, № 3: 174–178.
- Zijl, Franziska van, Georg Krupitza, and Wolfgang Mikulits. 2011. "Initial Steps of Metastasis: Cell Invasion and Endothelial Transmigration." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 728 (1–2): 23–34.

9. Material Suplementar

QUADRO S1 Lista de iniciadores empregados para análise da expressão de genes envolvidos na EMT por PCR/qPCR.

Gene (Acesso ¹)	Sequência ²	Ampl (pb) ³	Ref.
<i>CDH1</i> (NM_004360.3)	S: TCCATTTCTTGGTCTACGCC AS: CACCTTCAGCCATCCTGTTT	362	(M. Wang et al. 2013)
<i>CDH2</i> (NM_001792.4)	S:AATTGAGCCTGAAGCCAAC AS: GTGGCCACTGTGCTTACTGA	101	(Wasil and Shair 2015)
<i>FN1</i> (XM_005246417.1)	S: GTGTTGGGAATGGTCGTGGGGAATG AS:CCAATGCCACGGCCATAGCAGTAGC	292	(G. Liu et al. 2010)
<i>GAPDH</i> (NC_000012.12)	S: GCTCCCTCTTTCTTGCAGCAAT AS: TACCATGAGTCCTTCCACGATAC	104	(Asahi-Ozaki et al. 2006)
<i>HSP90AB1</i> (NM_007355)	S:TCTGGGTATCGGAAAGCAAGCCAS: GTGCACTTCCTCAGGCATCTTG	80	(Jacob et al. 2013)
<i>BNLF1</i> (LMP1) (NC_007605.1)	S: ATGGAACRCGACCTT AS: TTAGTCATAGTAGCTTAGCT	120	(Mei et al. 2006)
<i>KRT8</i> NM_001256282	S: TGTGCCTTGACCTCAGCAATG AS: AGCTGGAGTCTCGCCTGGAA	173	(M.-Z. Sun et al. 2013)
<i>KRT18</i> NC_000012.12	S: TAGATGCCCCCAAATCTCAG AS: CACTGTGGTGTCTCTCCTCAA	133	(B. Yin et al. 2016)
<i>MMP2</i> (NM_004530.4)	S:ATAACCTGGATGCCGTCGT AS: AGGCACCCTTGAAGAAGTAGC	63	(Satpathy et al. 2009)
<i>MMP9</i> (NM_04994.2)	S:CGCACGACGTCTTCCAGTAC AS:AGGATGTCATAGGTCACGTAGC	132	(Safranek et al. 2009)
<i>RPS13</i> (NM_001017)	S: AGAAACGGCTACCACATCCAAS: CACCAGACTTGCCCTCCA	87	(Jacob et al. 2013)
<i>RPS1818</i> (NT_167214.1)	S: CGAAAGCATCTTGAGAGGAAC AS: TCGAGCCAAACGGTGAATC	169	(Jacob et al. 2013)
<i>SNAI2</i> (NM_003068.4)	S: TGGTTGCTTCAAGGACACAT AS: GTTGCAGTGAGGGCAAGAA	66	(Gras et al. 2014)
<i>SNAI1</i> (NM_005985.3)	S: TGGTTGCTTCAAGGACACAT AS: GTTGCAGTGAGGGCAAGAA	85	(Gras et al. 2014)
<i>TWIST</i> (NM_001128128.2)	S: GCTGCAGGACTCTAATCCAGA AS: ATCTCCGGAGGTGGGATG	94	(G. Yin et al. 2010)
<i>VIM</i> (XM_006717500.1)	S:GGCATCACTATGGACTTTCTCTATT AS: GGCCAGTTTGATCCCAGTATT	134	(Zhuravel et al. 2014)
<i>ZEB1</i> (NM_000474.3)	S: GTGAATACCAAGACCTGCTCAA AS: AGGGAGGAAAAGTTTGGAAAGAG	101	(Xiong et al. 2012)
<i>ZO1</i> (NM_003257.4)	S:GCCAATAAGCAAACGATTCTG AS: TTTGGCTGGATCACTTTCAAG	374	(Jiménez-Salazar et al. 2014)

¹ Código de acesso na base de dados *Gene* dos Centro de Informações Biotecnológicas dos EUA (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*), ² S: sense; A: antisense; ³ Tamanho esperado do amplicons (em pares de base)

Os experimentos de qPCR foram feitos no termociclador Rotor Gene-Q5 (Qiagen). A seguir, tabelas com o ciclo limiar (*Theshold Cycle – Ct*) para cada gene alvo obtido nos experimentos obtidos em qPCR para cálculo de expressão gênica.

TABELA S1 Cts obtidos em reação de qPCR para genes associados ao processo EMT para células HEK293 transfectadas com os vetores pZsGreen, pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. Experimento realizado em triplicata – ¹Rotor 1.

Alvos	pZsGreen			pZsGLMP1_B95.8			pZsGLMP1_M81		
	² E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
HSP90AB1	17,02	17,19	17,06	17	18,13	18,57	17,11	17,19	17,02
CDH1	23,25	22,94	22,71	22,51	23,58	24,13	22,21	23,1	22,36
EBV BNLF1	² NG	NG	NG	14,99	16,67	17,29	14,11	14,29	14,87
RPS13	18,78	18,31	18,25	18,54	19,24	19,49	18,67	18,22	18,23
RPS18	4,58	4,41	4,72	4,58	4,28	4,69	4,78	4,76	5
SNAI2	24,41	24,91	24,67	24,55	25,89	25,98	24,54	25,07	24,36
TWIST	23,85	22,89	23,29	23,88	23,28	23,2	23,91	23,13	23,35
ZEB1	23,34	23,58	24,13	23,17	23,68	25,78	23,08	23,57	23,74
ZO1	18,86	19,73	19,64	18,89	20,48	20,74	19,28	19,66	19,44

¹Rotor – placa para qPCR utilizada no termociclador RotorGene; ²E – Experimentos independentes de transfecção celular; ³NG – Negativo, sem amplificação

TABELA S2 Cts obtidos em reação de qPCR para genes associados ao processo EMT para células HEK293 transfectadas com os vetores pZsGreen, pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. Experimento realizado em triplicata – Rotor 2.

Alvos	pZsGreen			pZsGLMP1_B95.8			pZsGLMP1_M81		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
HSP90AB1	17,37	17,05	17,37	17,4	18,12	18,52	16,87	16,86	18,53
EBV BNLF1	NG	NG	NG	15,11	16,92	17,51	14,2	14,79	15,32
FN1	17,77	18,46	19,25	18,15	19,77	20,68	18,42	19,25	18,8
MMP2	23,74	23,88	24,6	24	25,14	25,5	24,13	24,04	23,23
RPS13	18,44	18,45	18,1	19,25	19,15	19,97	18,76	18,17	18,53
RPS18	4,78	4,32	4,91	4,78	4,28	4,71	5,02	4,78	5,02
VIM	18,94	18,92	18,85	18,37	19,61	20,01	19,01	18,66	18,31

TABELA S3 Cts obtidos em reação de qPCR para genes associados ao processo EMT para células HEK293 transfectadas com os vetores pZsGreen, pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. Experimento realizado em triplicata – Rotor 3.

Alvos	pZsGreen			pZsGLMP1_B95.8			pZsGLMP1_M81		
	¹ E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
<i>HSP90AB1</i>	15,22	15,35	15,46	15,3	16,28	16,93	15,35	15,21	15,54
<i>CDH2</i>	19,11	18,98	18,93	19,81	19,75	20,9	20,01	19,62	19,52
<i>EBV BNLF1</i>	² NG	NG	NG	13,27	14,76	16,22	12,82	13,22	13,21
<i>RPS13</i>	17,42	17,05	16,77	17,51	18,02	18,46	17,6	17,09	16,46
<i>RPS18</i>	2,66	3,24	2,23	2,66	1,97	2,34	2,88	2,03	2,26
<i>SNAI1</i>	21,74	21,95	22,87	21,68	22,88	23,74	21,83	22,58	21,95

TABELA S4 Cts obtidos em reação de qPCR para genes associados ao processo EMT para células HEK293 transfectadas com os vetores pZsGreen, pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81. Experimento realizado em triplicata – Rotor 4.

Alvos	pZsGreen			pZsGLMP1_B95.8			pZsGLMP1_M81		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
<i>HSP90AB1</i>	16,81	14,57	14,62	14,46	14,99	16,3	14,23	15,06	14,79
<i>KRT8</i>	22,27	18,85	18,8	19,45	19,53	19,45	19,02	18,47	18,73
<i>KRT18</i>	21,8	18,88	18,73	18,73	18,94	19,96	18,97	18,81	18,64
<i>MMP9</i>	28,86	26,73	27,89	26,68	26,72	27,38	27,52	28,17	27,59
<i>RPS13</i>	20	16,96	16,4	16,75	17,54	18,47	16,68	16,74	16,13
<i>RPS18</i>	8,84	5,28	5,86	6,1	5,24	5,78	5,99	6,27	6,08

TABELA S5 Cts obtidos em reação de s qPCR para genes associados ao processo EMT para células NP69 transfectadas os vetores pZsGreen, pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81 e selecionadas por citometria de fluxo. Experimento realizado em triplicata -¹Rotor 1.

Alvos	pZsGreen			pZsGLMP1_B95.8			pZsGLMP1_M81		
	² E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
<i>HSP90AB1</i>	23,64	22,8	24,03	21,61	21,18	22,63	23,62	21,21	21,45
<i>CDH1</i>	32,91	31,1	34,57	33,21	31,06	34,05	28,85	31,88	32,65
<i>EBV BNLF1</i>	³ NG	NG	NG	16,17	16,52	15,85	17,76	15,22	13,54
<i>RPS13</i>	23,1	22,04	23,16	21,41	21,25	22,55	23,23	21,28	21,47
<i>RPS18</i>	9,12	8,07	8,91	8,15	7,68	8,93	9,25	7,5	7,78
<i>SLUG</i>	28,13	26,6	27,27	25,13	24,99	26,02	27,29	24,85	24,77
<i>SNAIL</i>	28,72	27,91	28,72	27,43	27,28	28,02	29,79	27,52	27,18
<i>TWIST</i>	27,84	26,57	28,13	25,39	24,89	26,96	27,79	24,33	25,55
<i>ZEB1</i>	28,89	27,23	28,9	27,16	28,22	28,63	29,27	27,08	27,83

¹Rotor – placa para qPCR utilizada no termocilador RotorGene; ²E – Experimentos independentes de transfecção celular; ³NG – Negativo, sem amplificação

TABELA S6 Cts obtidos em reação de s qPCR para genes associados ao processo EMT para células NP69 transfectadas os vetores pZsGreen, pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81 e selecionadas por citometria de fluxo. Experimento realizado em triplicata - Rotor 2.

Alvos	pZsGreen			pZsGLMP1_B95.8			pZsGLMP1_M81		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
<i>HSP90AB1</i>	21,52	20,29	21,24	19,32	18,83	20,38	21,75	18,54	18,86
<i>CDH2</i>	24,38	23,68	24,99	21,65	21,76	23,3	23,99	21,64	22,45
<i>EBV BNLF1</i>	NG	NG	NG	14,01	14,51	13,72	15,55	13,02	11,46
<i>FN1</i>	20,11	18,76	19,84	17,63	16,61	18,81	19,52	16,21	17,18
<i>MMP2</i>	28,08	27,42	28,54	25,77	25,47	27,97	28,06	25,07	26,52
<i>RPS13</i>	20,8	19,7	21,25	19,44	19,14	20,64	21,22	19,1	19,39
<i>RPS18</i>	7,53	6,47	7,58	6,46	6,26	7,33	7,57	6,2	6,44
<i>VIM</i>	22,72	21,22	22,07	19,82	19,33	20,98	21,88	19,27	19,66
<i>ZO1</i>	22,84	21,31	23,41	21,02	21,93	22,77	22,85	21,08	21,05

TABELA S7 Cts obtidos em reação de s qPCR para genes associados ao processo EMT para células NP69 transfectadas os vetores pZsGreen, pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81 e selecionadas por citometria de fluxo. Experimento realizado em triplicata - Rotor 3.

Alvos	pZsGreen			pZsGLMP1_B95.8			pZsGLMP1_M81		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
<i>HSP90AB1</i>	20,2	20,16	23,21	18,51	18,26	19,69	20,54	18,19	18,78
<i>KRT8</i>	21,96	21,89	23,43	21,87	21,11	23,1	23,96	21,36	21,62
<i>KRT18</i>	21,07	21,03	21,93	20,62	20,26	21,49	22,92	20,27	20,62
<i>MMP9</i>	31,1	29,53	31,33	24,83	24,99	27,17	28,1	24,86	25,27
<i>RPS13</i>	21,16	20,25	21,94	19,61	19,15	20,99	21,93	19,63	19,84
<i>RPS18</i>	7,57	7,6	8,28	7,13	7,2	8,07	8,6	7,08	7,37

TABELA S8 Cts obtidos em reação de s qPCR para genes associados ao processo EMT para células NP69 transfectadas os vetores pZsGreen, pZsGLMP1_B95.8 e pZsGLMP1_M81 e selecionadas por citometria de fluxo. Experimento realizado em triplicata - Rotor 4.

Alvos	pZsGreen			pZsGLMP1_B95.8			pZsGLMP1_M81		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
<i>HSP90AB1</i>	22,58	22,28	22,56	20,75	20,69	22,01	22,01	22,62	20,25
<i>EBV BNLF1</i>	NG	NG	NG	16,76	16,94	16,32	18,16	15,78	16,97
<i>RPS13</i>	22,6	22,04	23,34	22,11	21,72	23,16	23,16	24,21	21,95
<i>RPS18</i>	9,27	9,93	10,14	9,93	8,69	10,26	10,91	8,99	9,23

TABELA S9 Cts obtidos em reação de qPCR para genes associados ao processo em EMT para células Hcat, RWPE-1, Saos2 e FGH utilizados na elaboração de painel de expressão gênica.

Alvos	Hcat	RWPE1	Saos2	FGH	Alvos	Hcat	RWPE1	Saos2	FGH
CDH1	20,7	21,27	31,6	33,48	CDH2	24,54	26,49	22,26	22,95
HSP90AB1	18,27	17,89	17,68	18,29	HSP90AB1	18,83	18,69	18,3	18,85
RPS13	20,02	20,12	20,29	20,34	FIN1	18,8	20,32	18,02	13,91
RPS18	8,62	10,03	8,7	7,79	MMP2	23,24	28,55	20,4	19,3
SNAI2	23,69	23,3	22,05	21,98	RPS13	20,56	20,62	21,15	20,99
SNAI1	30,32	24,52	23,54	24,72	PRRS18	8,42	9,53	9,06	7,82
TWIST	31,11	27,61	23,93	23,27	VIM	34,33	23,4	18,4	15,22
ZEB1	31,18	30,63	23,35	22,47	ZO1	20,96	19,49	18,1	19,63