

## **RELATÓRIO CIENTÍFICO FAPESP**

**BÁRBARA GRASIELE MÜLLER COAN**

**Doutoranda / Processo: 2017/22312-5**

**PROF. DR. DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA**


**Orientador**

**Fevereiro de 2019**

Relatório científico FAPESP - "Efeito de miRNAs endógenos na progressão dos cânceres"

PROJETO DE DOUTORADO

**"Efeitos de microRNAs endógenos humanos no repertório  
de células tronco cancerígenas e progressão de cânceres  
*in vivo* empregando modelo Zebrafish"**

X 

BÁRBARA GRÁSIELE MÜLLER COAN  
Doutoranda / Processo: 2017/22312-5

X 

PROF. DR. DELSON ELGUI DE OLIVEIRA  
Orientador

Proposta de pesquisa para Doutorado  
junto ao Programa de Pós-graduação  
em Patologia da Faculdade de  
Medicina de Botucatu, UNESP.  
Trabalho a ser desenvolvido no grupo  
ViriCan, Faculdade de Medicina de  
Botucatu - UNESP.

Botucatu, SP  
março de 2019

---

## 1 Plano Inicial

### 1.1 Resumo

Os cânceres são doenças neoplásicas malignas de origem multifatorial que tipicamente ocorrem em indivíduos adultos, sendo mais frequentemente carcinomas. O processo de desenvolvimento do câncer, a carcinogênese, está dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão. É na progressão que geralmente há a detecção da doença e seu início é caracterizado pela aquisição do fenótipo maligno pela célula (transformação celular). As células transformadas podem adquirir diversas propriedades (e.g. autonomia na geração de estímulos pró-proliferativos e remodelamento vascular) que propiciam condições para a disseminação de células neoplásicas para locais distantes do sítio primário, num processo denominado de metástase. Para o estabelecimento de uma metástase se faz necessária a modificação do microambiente tumoral do novo local para que as células recém-chegadas sobrevivam e proliferem. Este microambiente favorece o aparecimento e sofre a influência das denominadas células tronco cancerígenas (Cancer Stem Cells - CSC) que possuem papel fundamental no estabelecimento e manutenção da metástase. A regulação gênica das células tumorais e a modulação das CSCs se deve em parte à influência de fatores epigenéticos, dentre eles destacam-se os microRNAs (miRNAs). Os miRNAs podem agir em diversos processos celulares, fisiológicos ou não, incluindo na carcinogênese e progressão tumoral. Em um estudo recente de nosso grupo de pesquisa, observamos que células imortalizadas de nasofaringe (NP69) apresentavam um aumento na expressão do miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p quando transfectadas com a proteína latente de membrana 1 (Latent Membrane Protein 1 – LMP1) do vírus de Epstein-Barr (Epstein-Barr Virus - EBV) proveniente da variante M81, em comparação com a LMP1 variante B95-8. Com base na predição *in silico* dos alvos desses miRNAs, identificamos que poderiam propiciar mudanças em vias de sinalização intracelular relacionadas à sobrevivência e proliferação celular, apoptose e angiogênese. No entanto, as conclusões desse estudo demandam análises funcionais adicionais sobre os efeitos desses miRNAs e sua importância na progressão de cânceres humanos. Por essas razões, o presente estudo visa investigar se os miRNAs miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p possuem papel importante na sobrevivência, proliferação, migração e invasão celular, repertório de células expressando marcadores de CSCs, tumorigênese e formação de metástases empregando ensaios *in vitro* e experimentação *in vivo* utilizando *zebrafish* como modelo biológico.

---

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

O presente estudo visa verificar a hipótese de que determinados miRNAs endógenos humanos têm papel relevante na patogênese de carcinomas, particularmente em aspectos da progressão tumoral associados a maior agressividade biológica dessas doenças, tais como potencial de tumorigênese e de disseminação metastática.

### 1.2.2 Objetivos específicos

1. Gerar modelos de células epiteliais humanas expressando proteína fluorescente vermelha para rastreamento em ensaios *in vitro* e *in vivo*;
2. Comparar os potenciais *in vitro* de proliferação, migração, invasão, transformação celular e análise da expressão de marcadores relacionados a CSCs em células nas quais se induziu elevação ou supressão da atividade dos miRNAs selecionados;
3. Gerar modelo de *zebrafish* expressando proteína fluorescente verde em células endoteliais para os ensaios *in vivo*;
4. Investigar angiogênese, tumorigênese e disseminação metastática *in vivo* em embriões de *zebrafish* microinjetados com células epiteliais humanas transformadas nas quais se induziu elevação ou supressão da atividade dos miRNAs selecionados.

### 1.3 Plano de Atividade e Cronograma

**Início Previsto: Setembro 2017    Término Previsto: Setembro 2021    Total: 48 meses**

Atividades	Ano 1			Ano 2			Ano 3			Ano 4		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Cursando disciplinas	•	•	•	•	•							
Estágio de docência		•	•	•								
Geração das linhagens celulares	•	•	•									
Padronização dos tratamentos			•									
Relatório Parcial 1			•									
Ensaio de migração celular <i>in vitro</i>				•	•							
Ensaio de invasão celular <i>in vitro</i>				•	•							
Ensaio de clonogenicidade celular <i>in vitro</i>				•	•							
Caracterização das células tronco cancerígenas						•	•					
Relatório Parcial 2						•						
Estabelecimento dos embriões de zebrafish GFP positivos						•	•	•				
Ensaio de angiogênese <i>in vivo</i>								•	•	•		
Ensaio de taxa de metástase <i>in vivo</i>								•	•	•		
Relatório Parcial 3												
Compilação e análise de resultados. Experimentos adicionais requeridos											•	
Redação da dissertação e defesa da tese de doutorado. Submissão de relatório final.												•

## 2 Andamento da Pesquisa

### 2.1 Preâmbulo

Os processos necessários para o andamento da pesquisa e obtenção de resultados robustos estão sendo feitos. Até o presente momento, foram finalizadas as padronizações de plaqueamento e tempo de incubação para os ensaios de migração e invasão, além da

---

seleção de genes alvos para os miRNAs selecionados, para que sirvam de controle para os ensaios com os miméticos. Agora, em andamento, estamos realizando a montagem de vetores para expressão constitutiva de miRNAs e vetores para validação do funcionamento dos miRNAs por meio de ensaio da luciferase. O estabelecimento de células expressando a proteína fluorescente vermelha será utilizado apenas para os ensaios *in vivo* com o modelo *zebrafish* para permitir a melhor visualização das células tratadas nos embriões com células endoteliais GFP positivas.

## 2.2 Atividades desenvolvidas no período

### 2.2.1 Linhagens celulares utilizadas

Para realização dos experimentos serão utilizadas linhagens celulares imortalizadas de nasofaringe NP69SV40 (chamada doravante de NP69), NP550hTert, NP460hTert e NP361hTert todas *wild type*. As linhagens acima foram devidamente validadas quanto à autenticidade genética por meio de análise de repetições curtas em tandem (Short tandem Repeats – STRs) com sistema comercial GenePrint 10 (Promega, Madison, WI, USA), conforme instruções do fabricante. As linhagens NP550hTert, NP460hTert e NP550hTert (gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa liderado Prof. George Sai-Wah Tsao, da Universidade de Hong Kong, China), foram validadas utilizando os resultados previamente obtidos pelo laboratório que as estabeleceu.

A linhagem NP69 foi cultivada em meio Keratinocyte SFM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, M, USA) suplementado com 5% de soro fetal bovino, 25µ/mL extrato de pituitária bovina (BPE) e 0,2ng/mL de EGF. As linhagens NP361hTert, NP460hTert e NP550hTert foram mantidas com meio Defied Keratinocyte\_SFM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, M, USA) suplementado com fatores de crescimento fornecidos pelo fabricante, e o meio EpiLife (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) na proporção 1:1. Todas serão mantidas em estufa úmida a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e contendo 0,4% de gentamicina no meio.

Quadro 1 - Iniciadores, reagentes e condições de termociclagem de PCR para detecção do DNA de micoplasma em linhagens celulares.

Alvos e iniciadores	Componentes da reação	Termociclagem
<b>Amplificação do DNA de micoplasma com primers específicos (MCGP)</b> Sense: 5' - ACACCATGGGAGCTGGTAAT – 3' Antisense: 5' - CTTTCATCGACTTTCAGA-CCAAGGCAT – 3'	Tampão PCR 10x (100 mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8,5), 50 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM DNTP mix, 30 µM iniciadores, 1U enzima Taq DNA Polimerase Convencional <sup>1</sup>	95°C - 3 min (1x); 94°C - 30s, 55°C - 30s, 72°C – 30s (37x); 72°C - 10min (1x), 4°C - ∞

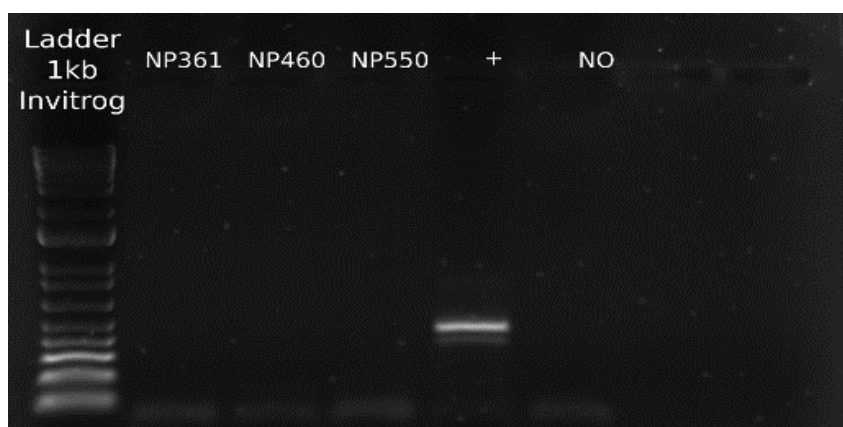
<sup>1</sup>NeoTaq DNA Polymerase

Figura 1 - PCR convencional para detecção de micoplasma nas linhagens NP361hTert, NP460hTert e NP550hTert. Todas as linhagens testadas foram negativas.

Todas as linhagens utilizadas são negativas para presença de micoplasma (Fig. 1), testadas utilizando os primers de flaqueamento externo (F1 e R1) do kit comercial *PCR Mycoplasma Detection Set* (Takara, Hong Kong, China) (Quadro 1). A linhagem NP69SV40 não está demonstrada no gel pois o lote utilizado já havia sido previamente testado.

Durante a expansão das linhagens (NP361hTert, 460hTert e 550hTert) foi realizada uma curva para verificar o tempo de duplicação de cada uma delas (Fig. 2). O tempo de duplicação variou entre as três linhagens, sendo de aproximadamente 84h (3,5 dias) para NP361hTert, 60h (2,5 dias) para NP460hTert e 144h para NP550hTert (6 dias). Vale ressaltar que há uma variação na contagem sendo que essas linhagens apresentam sensibilidade ao processo de tripsinização, ocorrendo elevada morte celular durante a expansão. Na tentativa de contrapor este problema, estamos realizando as expansões utilizando a enzima Tryple (Thermo Fisher Scientific). A NP69SV40 possui um tempo de duplicação de aproximadamente 48h e não possui sensibilidade a tripsina.

---

Caso as intempéries da tripsinização com a linhagem NP460hTert sejam resolvidas, esta será utilizada majoritariamente para os ensaios experimentais. Isto devido à deleção homozigótica de p16, ganho de fragmento 17q21-q25 no cromossomo 11p15, ativação de NF-kB e aumento da expressão de Id1. Estas alterações descritas merecem destaque pois são encontradas tanto nesta linhagem como em células pré-malignas e carcinomas de nasofaringe (Li et al., 2006).

Os ensaios de padronização foram realizados com a NP69, devido às etapas de validação e expansão das demais linhagens, além da sensibilidade à tripsinização previamente mencionada da linhagem NP460hTert.

### *2.2.2 Padronização dos ensaios celulares*

Para realização dos ensaios celulares após o tratamento com miméticos, ou com células expressando constitutivamente o miRNA de interesse, se faz necessária a padronização de tempos de incubação e quantidade de células a serem plaqueadas. Isto para que no momento da transfecção e coleta de material para extração ou imagem, as células ainda estejam em fase de crescimento exponencial.



### 2.2.2.1 Padronização de plaqueamento

Para seleção do número ideal de células utilizadas para plaqueamento em placa de cultura com 24 poços, foi realizada uma curva, variando de  $0,5$  a  $2 \times 10^5$  células por poço. As imagens foram coletadas com 24, 48 e 72h pós plaqueamento (Fig. 3). A placa foi mantida em estufa úmida

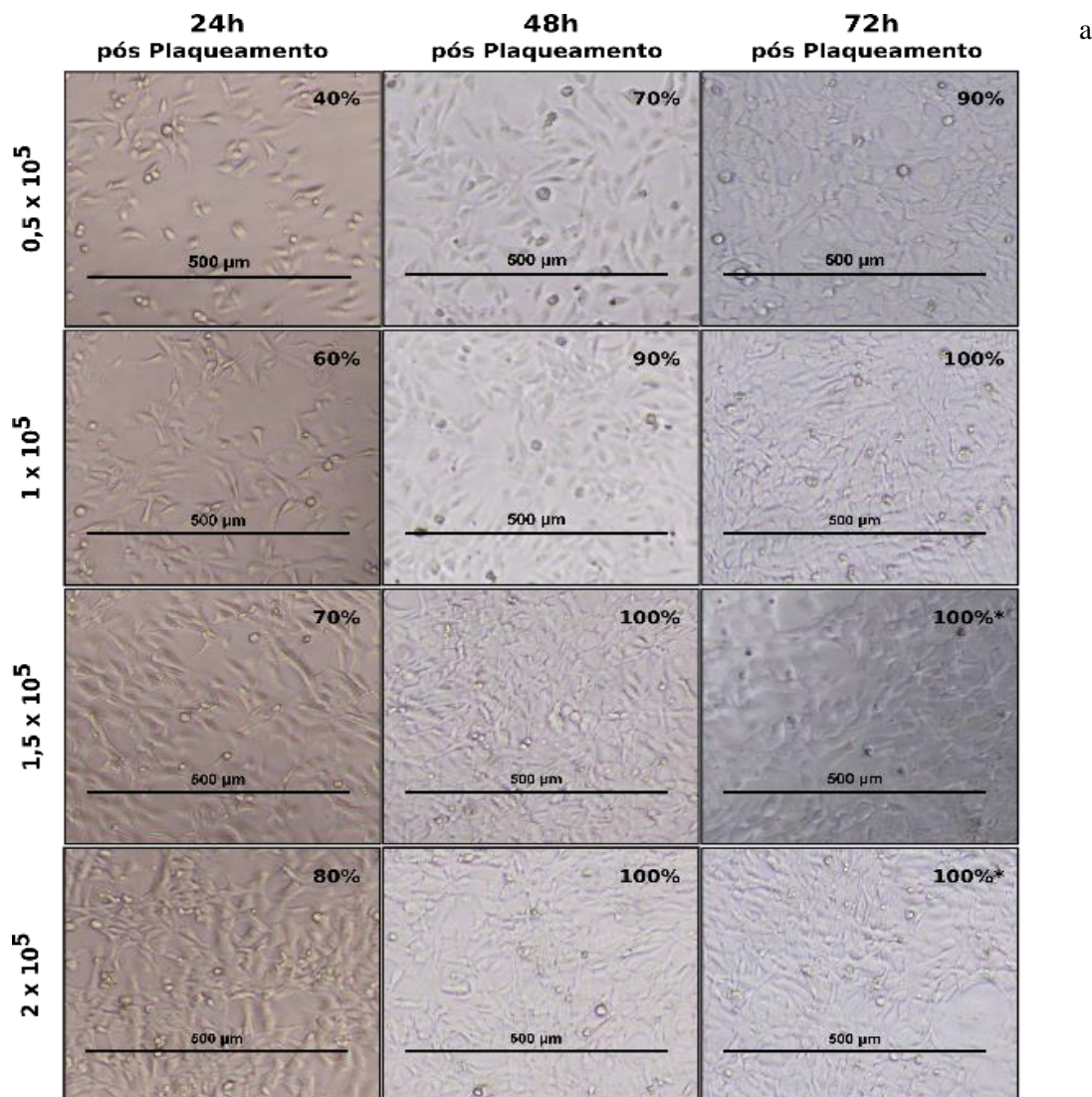


Figura 2 - Curva de plaqueamento celular utilizando a linhagem imortalizada de nasofaringe NP69. Em cada linha segue a quantidade plaqueada e em cada coluna as respectivas coletas de imagens com 24, 48 e 72h pós-plaqueamento.

$37^{\circ}\text{C}$  e o ensaio foi realizado em duplicata técnica. Para a transfecção celular com os miméticos de miRNA, a confluência 24h pós-plaqueamento deve estar entre 60 e 80%, e após 48h (data da coleta para extração de RNA) em torno de 90%. Com base na padronização realizada, foi selecionado o plaqueamento de  $1 \times 10^5$  células por poço para a placa com 24 poços.

### 2.2.2.2 Padronização de plaqueamento para migração e invasão “transwell”

Para padronização da quantidade de células a serem plaqueadas no inserto (poro de 8µm) ThinCert™ (Greiner Bio-One, Nürtingen, Germany) para placa de 24 poços, foram utilizadas entre 0,25 e  $1 \times 10^5$  células por inserto e incubadas por 8, 12, 16 e 24h (Fig. 4). Inicialmente, foi utilizada uma quantidade única de células ( $1 \times 10^5$ ) e coletadas as imagens de 8, 12, 16 e 24h. As imagens foram obtidas em microscópio invertido com aumento de 4x, com duas imagens por inserto, correspondendo a 25% de sua área total. Para isto, o inserto foi retirado da placa, fixado com etanol 70% e corado com cristal violeta. Após seca, a membrana foi posicionada entre lâmina

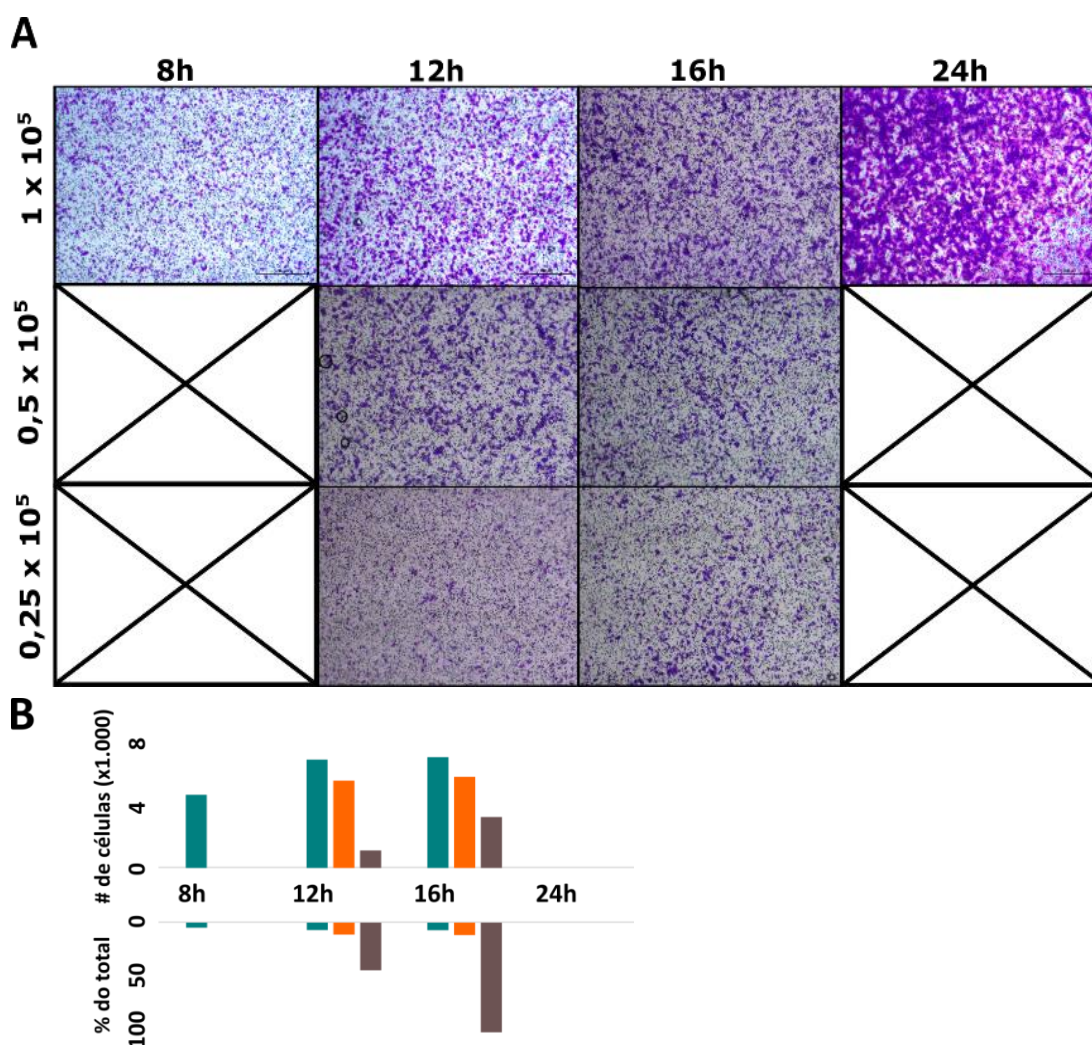


Figura 3 – Ensaio para padronização do número de células e tempo de incubação para ensaio de migração e invasão *transwell* com células imortalizadas de nasofaringe (NP69). (A) Imagem da área externa da membrana corada com cristal violeta. As linhas são referentes às diferentes quantidades plaqueadas e as colunas correspondem ao tempo de incubação. (B) Resultados da contagem das imagens obtidas. Barras da direita correspondem ao número de células que passaram pelos poros da membrana e barras da esquerda, a porcentagem do total de células que este número corresponde. Pode-se ver que quanto menor a quantidade de células plaqueadas, maior a porcentagem do total que consegue migrar. Foram plaqueadas 1, 0,5 ou  $0,25 \times 10^5$  células, representadas em azul, laranja e cinza respectivamente. A contagem celular com 24h de incubação se tornou inviável devido à alta densidade celular.

e lamínula com óleo mineral. Para a contagem celular, foi utilizado o software Image J (Schneider

---

et al., 2012) e a estimativa do número de células totais foi baseado na contagem das duas imagens obtidas e extrapolada para número de células na área total.

Com base nos primeiros resultados, foram testadas novas quantidades de plaqueamento com 12 e 16h de incubação, pois obtiveram os melhores resultados. Os parâmetros para seleção do tempo de incubação e quantidade de células ideal a serem utilizadas baseou-se em três parâmetros principais: densidade celular (Fig. 4A), número de células por imagem (Fig. 4B) e percentual das células plaqueadas que passaram pelos poros (Fig 4B). A densidade celular foi o primeiro parâmetro observado e sua importância se deve ao fato de que quando a densidade celular na imagem é alta (i.e.  $1 \times 10^5$  células com 24h de incubação) a contagem celular se torna inviável e com alta probabilidade de erro de contagem devido à sobreposição celular.

O número de células presentes no lado externo da membrana é outro fator de importância a ser considerado. Quando este for alto, assim como em densidades altas, dificulta uma contagem acurada, e quando baixo, reduz a detecção da inibição da migração induzida por um tratamento, como miRNAs por exemplo.

O terceiro fator importante a se considerar é qual o percentual das células plaqueadas que se encontram do lado externo da membrana. Quando o percentual das células que migraram é muito alto (i.e.  $0,25 \times 10^5$  células plaqueadas com 16h de incubação), não existem células remanescentes no interior do inserto, portanto, se o tratamento testado estimular a migração/invasão, não há possibilidade da visualização deste efeito. O contrário também é verdadeiro, se o percentual de células no exterior da membrana for muito baixo, isto dificultaria a detecção de uma inibição na migração/invasão induzido pelo tratamento utilizado. Com base nestes parâmetros, o tempo e número de células selecionado para plaqueamento foi  $0,5 \times 10^5$  com tempo de incubação de 16h para os ensaios *transwell* de migração e invasão.

### 2.2.3 Montagem de vetores

Durante o período, foram realizadas as primeiras clonagens para a montagem dos vetores de luciferase. Estes serão utilizados para validação da função dos miRNAs (hiperexpressão por meio de miméticos ou transdução lentiviral) e vetores para hiperexpressão de miRNAs.

#### 2.2.3.1 Vetores para validação funcional dos miRNAs por meio da luciferase

Para validação funcional dos miRNAs utilizados, tanto no tratamento com miméticos, como para expressão constitutiva por meio de vetores lentivirais, estão sendo montados vetores de luciferase utilizando psiCHECK<sup>TM</sup>-2 (Promega).

Após o recebimento do vetor comercial, o mesmo foi transformado em bactérias *E. coli* DH5α Subcloning Efficiency (Thermo Fisher Scientific), selecionadas em placa LB Agar com 100µg/mL de ampicilina e verificado por meio de digestão enzimática.

Quadro 2 - Componentes e condição da reação de digestão enzimática para verificação do vetor de luciferase psiCHECK2

Propósito experimental	Componentes da reação	Condições da reação
Verificação do vetor psiCHECK2 vazio após transformação.	Tampão NEB 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, pH 7.9), BSA 1x, 2U de cada Enzima ( EcoRI ou EcoRI+NheI), 1µg de DNA e H <sub>2</sub> O q.s.p. 20µL.	Incubação a 37°C por 2h, inativação 65°C por 20 min.
Verificação do vetor psiCHECK2 vazio após transformação.	Tampão NEB 2 (50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 1 mM DTT, pH 7.9), BSA 1x, 2U de cada Enzima Alw44I (Apall), 1µg de DNA e H <sub>2</sub> O q.s.p. 20µL.	Incubação a 37°C por 2h, inativação 65°C por 20 min.

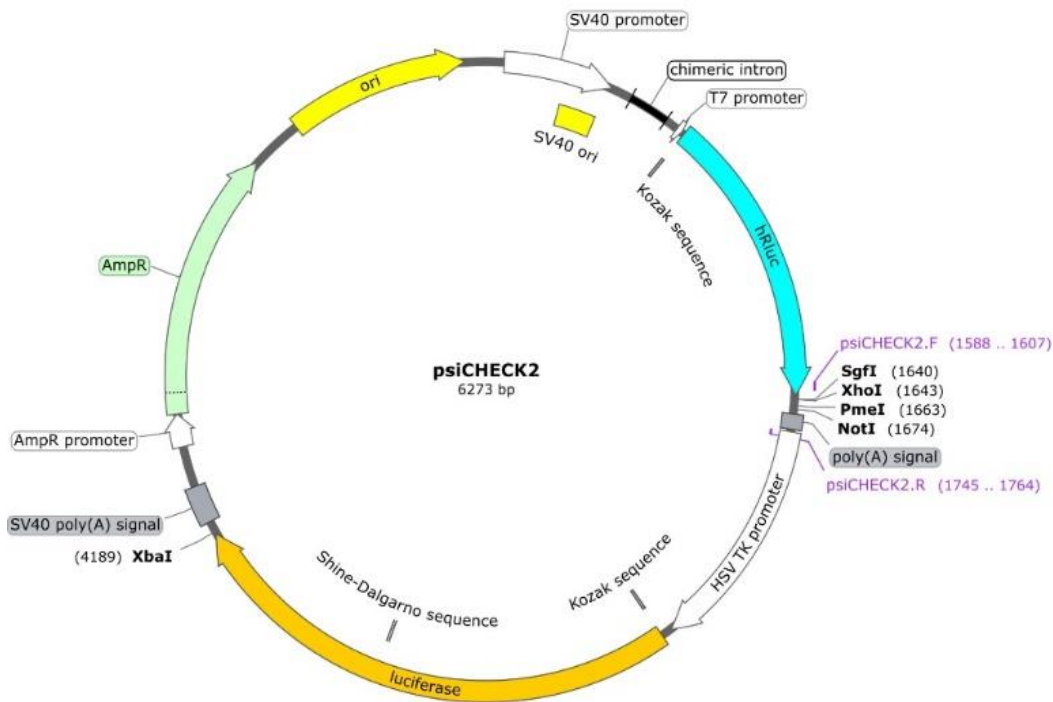


Figura 4 - Mapa do vetor psiCHECK2 contendo as enzimas utilizadas para digestão (Alw44I, EcoRI e NheI), enzima para validação da presença do inserto (XbaI) e primers para amplificação da região do inserto (psiCHECK2.F e psiCHECK2.R). The image was prepared using SnapGene® software (from GSL Biotech; available at [snapgene.com](http://snapgene.com)).

As enzimas foram selecionadas de modo que ocorressem cortes em regiões distintas e consequentemente a validação do psiCHECK2. As três enzimas utilizadas foram Alw44I, EcoRI e NheI (Quadro 2). O esperado era que a enzima Alw44I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) clivasse o vetor em duas regiões (4702 e 5948) (Fig. 5), originando duas bandas com 1246 e 5027 pb (Fig. 6). Do mesmo modo, a digestão com a EcoRI (New England Biolabs) também possuía o sítio de clivagem em duas regiões do vetor (1654 e 2386) (Fig. 5), sendo esperadas duas bandas com 732 e 5541 pb (Fig. 6). Entretanto, a digestão realizada utilizando EcoRI juntamente com NheI (New England Biolabs) adicionou mais um sítio de clivagem (região 684), originando três bandas com 732, 970 e 4571 pb. O resultado se mostrou dentro do esperado com as três digestões distintas, confirmando assim o vetor recebido (Fig. 6).

Para o início das clonagens, foi então realizado o desenho dos insertos contendo a região complementar ao miRNA de interesse, para que quando houver interação do miRNA hiperexpresso (seja com transfecção dos miméticos ou vetor lentiviral), ocorra inibição da luciferase. O desenho do inserto foi realizado conforme descrito no artigo experimental da Promega (Schagat and Vidugiriene, 2008), sendo constituído pela sequência complementar ao miRNA maduro (5p ou 3p) e três regiões correspondentes a sítios para enzimas de restrição. Um sítio para enzima de restrição situado na região 5' da sequência (XhoI), o segundo para checagem da inserção após ligação (XbaI - New England Biolabs) e uma terceira na região 3' (PmeI) para clonagem unidirecional (Fig. 7).

Foi realizado o desenho de insertos para todos os miRNAs provenientes do mesmo pre-miRNA, ou seja, dos comumente denominados miRNAs “irmãos”. Por exemplo, estudaremos o miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p (Quadro 3), porém, para demonstrar a especificidade dos miméticos e detectar sua expressão quando o vetor lentiviral for utilizado, adicionalmente serão estabelecidos os vetores da luciferase para miR-100-3p, miR-192-3p e miR-574-5p. Até o

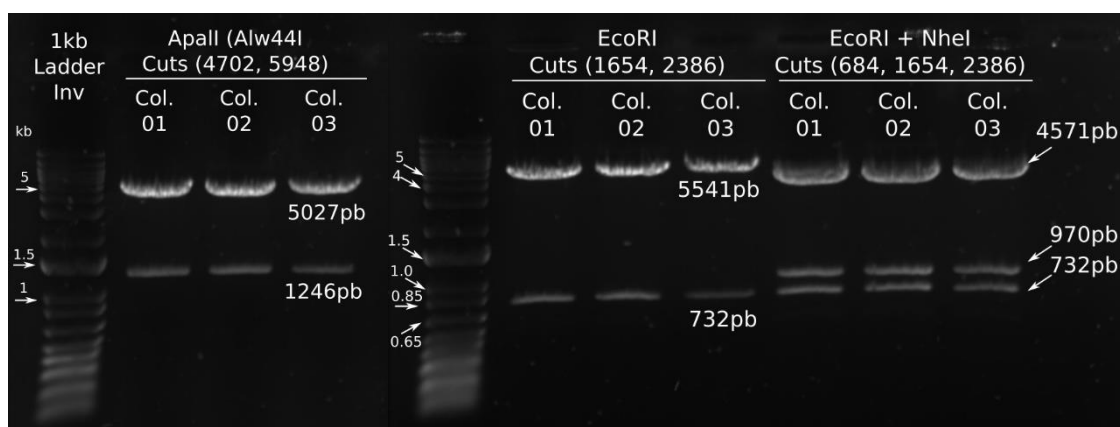


Figura 5 - Gel de agarose 0,7% para verificação do vetor de luciferase psiCHECK2. Coluna de esquerda demonstra a digestão utilizando a enzima Alw44I somente; Coluna central demonstra a digestão com EcoRI somente; e a coluna da direita demonstra digestão de EcoRI com NheI.



momento, foi sintetizada apenas as sequências referentes ao miR-100-5p, para que sejam feitas as padronizações, e assim que o vetor estiver finalizado e validado, serão sintetizadas as demais.

Estes oligonucleotídeos correspondentes à sequência exata e complementar foram sintetizados e normalizados a 10 pmol. Para o anelamento, proporções equimolares das sequências em *T4 Ligase Buffer* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) foram incubados a 95°C e então em temperatura ambiente por 30 min para que a ligação ocorra de maneira espontânea. Isto se torna possível devido à baixa energia da reação ( $\Delta G \sim -70\text{kcal/mol}$ ). Vale destacar que no desenho do inserto, não é inserida a sequência completa da enzima de restrição,

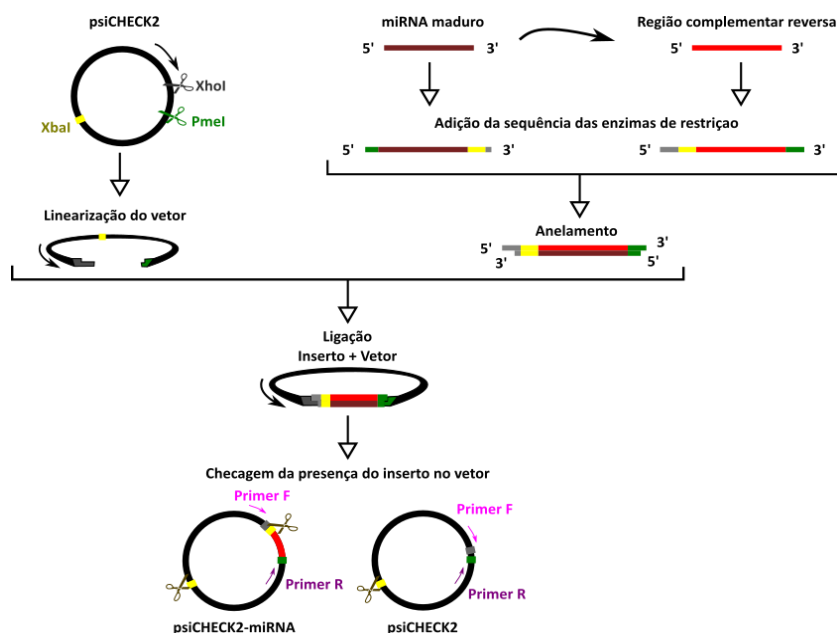


Figura 6 - Desenho esquemático representando a montagem do vetor de luciferase psiCHECK2 para checagem do funcionamento dos miRNAs transfectados ou transduzidos em células imortalizadas de nasofaringe. Após a digestão com enzimas de restrição do sítio de clonagem do vetor psiCHECK2, foi realizada a ligação do vetor com o inserto em fita dupla. O inserto contém as regiões complementares do sítio de clonagem e um sítio para a enzima XbaI, para confirmação do vetor final. Para checagem da presença do inserto, foi realizada uma PCR do vetor final e quando confirmada, a digestão com a enzima XbaI, sendo que ocorrerá clivagem em um local quando o vetor estiver vazio, e dois quando o vetor estiver com o inserto.

mas somente a região até o sítio de clivagem da mesma. Com isso, se forma um *overhang*, permitindo o anelamento unidirecional do inserto no vetor sem a reação de digestão prévia do inserto. Quando necessário, foi adicionado uma região *filler* para reduzir a probabilidade da formação de autodímeros e aumentar o anelamento das fitas sense e antisense (Fig. 7 e Quadro 3).

Em paralelo com o preparo da dupla fita do inserto, o vetor psiCHECK2 foi digerido com as enzimas PmeI e XhoI (New England Biolabs) e purificado utilizando um recorte do gel de agarose contendo a região com a presença do vetor linearizado, utilizando o kit QIAEX II (Qiagen). O vetor digerido foi então incubado com a enzima Fosfatase antártica (New England Biolabs) para evitar a recircularização espontânea do mesmo.

Quadro 3 - Sequência de oligonucleotídeos para inserção em vetor de luciferase psiCHECK2. Em verde, amarelo e cinza, sequências referentes às enzimas PmeI, XbaI e XhoI respectivamente; em negrito, sequência referente ao miRNA; e em letras minúsculas vermelhas, regiões “filler”.

miRNA	Cód. miRBase		Sequência para síntese
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	Idêntica	5' – <b>AAAC</b> AAACCGTAGATCCGAACCTGTG <b>TCTAGAT</b> TCGAG – 3'
		Complementar	5' – <b>CTCTAGAC</b> ACAAGTTCGGATCTACGGGT <b>GTTTT</b> – 3'
hsa-miR-100-3p	MIMAT0004512	Idêntica	5' – <b>AAAC</b> CAAGCTTGTATCTATAGGTATG <b>TCTAGAT</b> TCGAG – 3'
		Complementar	5' – <b>CTCTAGAC</b> CATACCTATAGATACAAGCTT <b>GTTTT</b> – 3'
hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	Idêntica	5' – <b>AAAC</b> tgCTGACCTATGAATTGACAGCC <b>acTCTAGAtaca</b> TCGAG – 3'
		Complementar	5' – <b>CtctaTCTAGAg</b> GGCTGTCAATTCATAGGTCAG <b>caGTTTT</b> – 3'
hsa-miR-192-3p	MIMAT0004543	Idêntica	5' – <b>AAAC</b> CTGCCAATTCATAGGTCACAG <b>TCTAGAT</b> TCGAG – 3'
		Complementar	5' – <b>CTCTAGAC</b> CTGTGACCTATGGAATTGGCAG <b>GTTTT</b> – 3'
hsa-miR-574-5p	MIMAT0004795	Idêntica	5' – <b>AAAC</b> gaTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGT <b>TCTAGAtg</b> TCGAG – 3'
		Complementar	5' – <b>CcaTCTAGa</b> gACACACTCACACACACACTCA <b>tcaGTTTT</b> – 3'
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	Idêntica	5' – <b>AAAC</b> CACGCTCATGCACACACCCACA <b>TCTAGAT</b> TCGAG – 3'
		Complementar	5' – <b>CTCTAGAT</b> TGTGGGTGTGTGCATGAGCGTG <b>GTTTT</b> – 3'

A primeira tentativa de ligação foi realizada utilizando a T4 Ligase (New England Biolabs) conforme recomendado no protocolo da enzima, na proporção molar 3:1 (inserto : vetor). Após a reação de ligação, foi realizada a transformação bacteriana utilizando a bactéria *E. coli* DH5α Subcloning Efficiency (Thermo Fisher Scientific) conforme recomendado no protocolo do fabricante, e cultivadas em placas de LB agar contendo 100µg/mL de ampicilina. As colônias obtidas foram purificadas utilizando o kit de miniprep QIAprep® (QIAGEN).

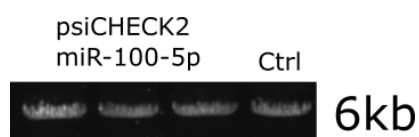


Figura 7 - Digestão de das colônias purificadas após reação de ligação e transformação bacteriana de vetores psiCHECK2-miR-100-5p. Houve a formação de uma banda única indicando a recircularização do vetor vazio e insucesso da ligação

Para checagem da presença do inserto no vetor de destino (psiCHECK2), foi realizada uma digestão com a enzima de restrição XbaI, conforme recomendações do fabricante. O esperado é que se houvesse a presença do inserto, haveria a formação de duas bandas (2.544pb e 3.766pb), se negativo, haveria a formação de uma banda com 6.310pb. Não houve a formação de nenhuma colônia com o inserto (Fig. 8). No total, forma checadas

8 colônias, todas negativas. Para facilitar a detecção de uma colônia positiva, foi sintetizado um par de primers (Quadro 4) para o sítio de clonagem do vetor psiCHECK2. A partir deste momento, iniciou-se um *troubleshooting* para verificar a causa do insucesso da ligação.

Quadro 4 - Sequência dos primers sintetizados para amplificação do sítio de clonagem do vetor psiCHECK2.

Alvos e iniciadores	Componentes da reação	Termociclagem
<b>Amplificação da região contendo a sequência do miRNA em psiCHECK2</b> Sense: 5' - ATCAAGAGCTTCGTGGAGCG – 3' Antisense: 5' - GCGAGGTCCGAAGACTCATT – 3'	Tampão PCR 10x (100 mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8,5), 50 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM DNTTP mix, 30 µM iniciadores, 1U enzima Taq DNA Polimerase Convencional <sup>1</sup>	95°C - 3 min (1x); 94°C - 30s, 55°C - 30s, 72°C – 30s (37x); 72°C - 10min (1x), 4°C - ∞

Para tanto, foram feitas as seguintes perguntas e estas, estão sendo respondidas:

1) *A reação de ligação psiCHECK2-miR-100-5p na proporção molar 3:1 não funcionou devido à T4 ligase utilizada?*

As reações de ligação (denominadas Lig#02 e 03) foram repetidas com outras duas enzimas, T4 Ligase (Promega) e Quick Ligation kit (New England Biolabs) conforme o protocolo do fabricante, porém, sem sucesso.

2) *Outra proporção molar poderia ter mais sucesso?*

Realizei duas outras tentativas com a T4 ligase convencional (New England Biolabs) utilizando a proporção molar 2:1 e 5:1 e a transformação e seleção foi realizada conforme descrita anteriormente (Lig#04 e 05) e novamente não houve sucesso na obtenção de colônias com inserto (Fig. 9).

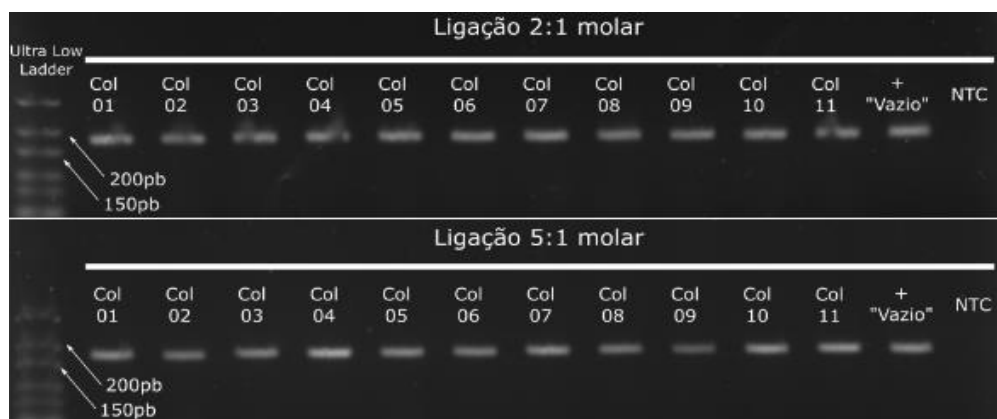


Figura 8 - PCR Colony de nova ligação realizada com psiCHECK2-miR-100-5p em duas proporções molar, 2:1 e 5:1. Não houve a formação de uma banda em 200pb, o que indica insucesso da reação.

3) *A reação de fosfatase antártica está funcionando?*

A reação de fosfatase antártica foi realizada novamente e de maneira concomitante com as enzimas PmeI e XhoI. Portanto o vetor foi digerido concomitantemente com PmeI, XhoI e Fosfatase antártica, conforme recomendado pelo fabricante (New England Biolabs). Esta reação de ligação foi feita na proporção molar 3:1 (Lig#06), porém, novamente não houve



---

sucesso. Neste caso, foi realizada uma PCR da reação de ligação para verificar se havia a presença da banda esperada (200pb). Como não houve, não foi realizada a transformação bacteriana e isolamento de colônias.

4) *A ligação não funciona devido à baixa quantidade de vetor digerido na reação?*

Foi visualizado que após a reação de digestão do vetor psiCHECK2, exista vetor não linearizado, ou seja, não digerido. Com isso, a quantidade inicial de vetor utilizada para a reação de ligação com a T4 Ligase (50ng), estaria subestimada, levando a alteração da proporção molar com o inserto desejada. Portanto, foi realizada uma nova ligação após a purificação com de gel de agarose do vetor digerido e tratado com fosfatase antártica (conforme descrito no item 3). O purificado foi então quantificado com Nanovue e a reação de ligação foi repetida na proporção molar 3:1. Para verificar se a ligação (Lig#7) teve sucesso, foi realizada uma PCR da reação de ligação utilizando os primers psiCHECK2 sintetizados. Como não houve amplificação na região esperada, não foi realizada a transformação bacteriana.

5) *Próximos passos:*

Devido ao insucesso das ligações anteriores, foi adquirida uma nova enzima T4 Ligase (New England Biolabs) nova. Será realizada uma nova ligação com esta enzima, quantificação do vetor digerido e do inserto com gel de agarose e será adquirida nova Fosfatase antártica. Caso as novas tentativas não tenham sucesso, será estudado um novo método para gerar o inserto. Assim que padronizada a metodologia utilizando o miR-100-5p, serão feitos os outros vetores com os demais miRNAs (miR-100-3p, -192-5p, -192-3p, 574-5p e 574-3p).

### **2.2.3.2 Vetores para expressão constitutiva dos miRNAs**

Para a hiperexpressão induzível dos miR-100, miR-192 e miR-574, as linhagens imortalizadas de nasofaringe serão transduzidas com construtos lentivirais codificando pre-miRNAs desenhados para os miRs de interesse e com expressão induzível por tetraciclina. Para tanto será empregada tecnologia de RNA de interferência (RNAi) com sistema comercial ViraPower™ HiPerform™ T-REx™ Gateway™ Vector Kit com pLenti6.3/TO/V5-DEST (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Sucintamente, sequências de pre-miRNAs para os miRs - 100, -192 e -574 serão desenhadas (conforme orientações da literatura e do fabricante do

sistema) e encaminhadas para síntese dos oligonucleotídeos em serviço especializado. Os oligonucleotídeos sintetizados serão anelados para geração dos insertos (DNA de fita dupla) e inseridos no vetor pENTR/SD/D-TOPO® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) para empregar a estratégia Gateway® de clonagem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), de modo a serem gerados construtos para expressão constitutiva de cada um dos miRs de interesse. Os cassetes de expressão dos pre-miRs nos construtos pENTR/SD/D-TOPO/miR-(100, 192 ou 574) obtidos serão então transferidos para o vetor de destino pLenti6.3/TO/V5-DEST por meio de recombinação.

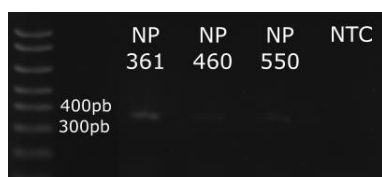


Figura 9 – Banda em gel de agarose após amplificação do pre-miR-100 (340pb) genômico de três linhagens imortalizadas de nasofaringe (NP361hTert, NP460hTert e NP550hTert).

Até o momento, foram sintetizados os primers para a amplificação do miR-100 (Quadro 5) e realizada amplificação para verificação da presença da banda de tamanho esperado utilizando três linhagens de nasofaringe imortalizadas (NP361hTert, NP460hTert e NP550hTert) (Fig. 10). Posteriormente, foi realizada a

PCR com a enzima polimerase de alta fidelidade para sequenciamento e seleção do amplicon que será utilizado para clonagem em vetor lentiviral.

Quadro 5 -- Componentes e condição da reação de PCR para amplificação da região do pre-miR-100 pra clonagem em pENTR.

Alvos e iniciadores	Componentes da reação	Termociclagem
<b>Amplificação da região contendo a sequência do miRNA em psiCHECK2</b>	Tampão PCR 10x (100 mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8,5), 50 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM DNTP mix, 30 µM iniciadores, 1U enzima Taq DNA Polimerase Convencional <sup>1</sup>	95°C - 3 min (1x); 94°C - 30s, 55°C - 30s, 72°C - 30s (37x); 72°C - 10min (1x), 4°C - ∞
Sense: 5' - ACCATGTTGTGAGAGTGGGACGAAGTC -3'		
Antisense: 5' - CTAAAAAGGTCTCCTCCTCCACC - 3'	Tampão PCR 10x (600 mM Tris-SO <sub>4</sub> , 180 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 8,9), 2.5 mM MgCl, 10 mM DNTP mix, 10 µM iniciadores, 1U enzima Taq DNA Polimerase Alta Fidelidade <sup>2</sup>	95°C - 1 min (1x); 94°C - 30s, 55°C - 30s, 65°C - 4min (35x); 72°C - 10min (1x), 4°C - ∞

<sup>1</sup>NeoTaq DNA Polymerase. <sup>2</sup>Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity;

## 2.2.4 Predição de genes alvo e enriquecimento de vias para miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p.

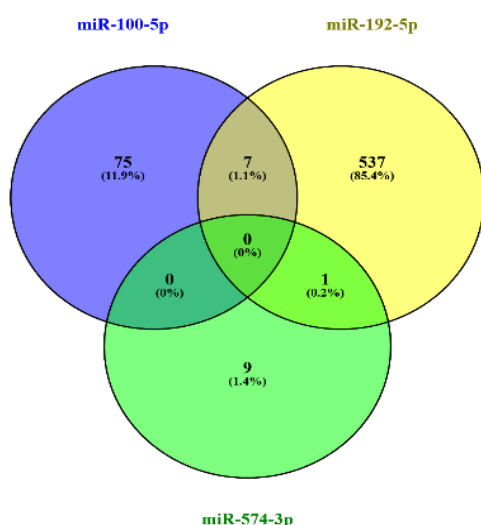


Figura 10 - Diagrama representando o número de genes alvo de cada miRNA selecionado. Em azul estão os genes alvo do miR-100-5p (82); em amarelo do miR-192-5p (545); e em verde do miR-574-3p (10). Existem 7 genes alvo de miR-100-5p e -192-5p, e um gene em comum entre miR-192-5p e -574-3p.

Para predição de genes alvo foi utilizada a plataforma online mirDIP (Shirdel et al., 2011; Tokar et al., 2018). Esta plataforma leva em consideração os parâmetros necessários para que ocorra o anelamento miRNA-RNA e o número de plataformas que realizaram a mesma predição, fornecendo um score único. Foram selecionados genes alvo que estavam na categoria “TOP 1%”, sendo 82, 545 e 10 genes para miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p respectivamente. Adicionalmente, foram observados quais genes eram alvos em comum por mais de um miRNA e quais

eram exclusivos (Fig. 11). De acordo com a literatura e levando em consideração o score do alvo, foram selecionados alvos para síntese de primers e verificação se poderiam ser utilizados como controle experimental do funcionamento do miRNA estudado, devido a sua inibição após o tratamento.

Adicionalmente, para um melhor entendimento da provável função biológica destes miRNAs, foi realizado um enriquecimento de vias utilizando o plugin ReactomeFIViz (Croft et

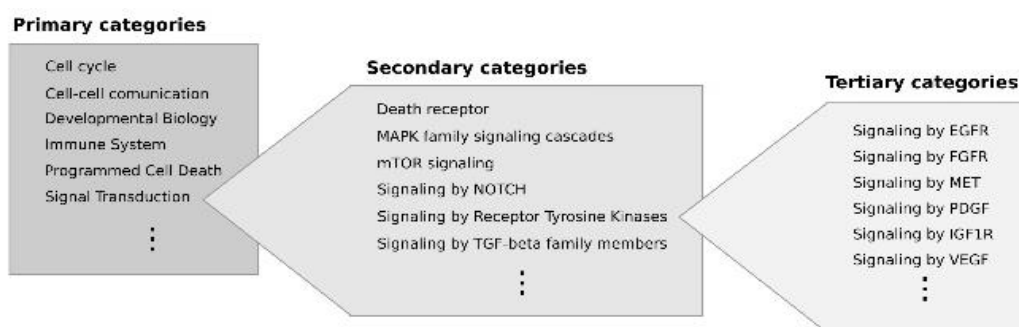


Figura 11 -Exemplos da categorização utilizada para o enriquecimento de vias realizado com os genes alvo dos miR-100-5p, -192-5p e 574-3p.

al., 2014) no software Cytoscape (Shannon et al., 2003). Com esta análise, foi possível observar quais vias provavelmente estão sendo desreguladas por um grupo de genes. Adicionalmente, foi possível observar a hierarquia em que ela se encontra, evitando assim, a contagem de um gene dentro de uma categoria (aqui descrito como hit) mais de uma vez.

---

Resumidamente, consideramos para análise as categorias primárias, secundárias e terciárias (Fig. 12). As categorias primárias são as mais abrangentes (i.e. Ciclo celular, morte celular programada e Sinalização celular), as secundárias estão dentro de uma categoria primária (i.e. Sinalização por MAPK e Tirosina kinases-TK) e por fim, as terciárias (mais específicas), que estão dentro de uma categoria secundária (i.e. Sinalização por EGFR e VEGF). Utilizando um script realizado em Python (por meio de colaboração), foi possível evitar a dupla contagem de um gene, portando, o número de hits em uma categoria indica o número de genes presente nela, sem (categorias terciárias dentro de sinalização por Tirosina Kinases), ele contará com 1 hit em cada duplicatas. Por exemplo, se um gene estiver presente em sinalização por EGFR e VEGF (categorias terciárias dentro de sinalização por Tirosina Kinases), ele contará com 1 hit em cada uma delas e quando verificarmos sinalização por Tirosina kinases, ele ainda será 1 hit.

Observando a análise de enriquecimento de via *in silico*, verificamos que dentre as categorias primárias, a sinalização celular está sendo modulada com maior intensidade (“Signal Transduction”) para os três miRNAs (Fig. 13A e 14A6). Algumas categorias primárias se mostraram exclusivas para determinados miRNAs: miR-100-5p regula exclusivamente a formação de RNAm (“Gene expression”) (Fig. 14A1); miR-192-5p está exclusivamente envolvido com replicação de DNA (“DNA Replication”), biogênese e manutenção mitocondrial (“Organelle biogenesis and maintenance”) e morte celular programada (“Programmed Cell Death”) (Fig. 14A2); e miR-574-3p está envolvido com transporte de vesículas intracelulares (“Vesicle-mediated transport”) (Fig. 14A3).

Considerando as categorias secundárias dentro de sinalização celular, todos os miRNAs regulam a tradução de genes envolvidos em sinalização por tirosina kinase e TGF $\beta$  (Fig. 13B e 14B5). Assim como dentro das categorias primárias, algumas categorias secundárias são exclusivas para determinados miRNAs: miR-100-5p parece estar exclusivamente envolvido em mTOR e IGF1R (Fig. 14B1), miR-192-5p em MAPK (Fig. 14B2 enquanto que miR-574-3p não regula nenhuma categoria secundária dentro de sinalização celular exclusivamente).

Observando as categorias terciárias (Fig. 13C e 14C) dentro de sinalização por tirosina kinases, observamos uma regulação exclusiva de genes alvo de miR-100-5p envolvidos em sinalização por receptores de insulina e MET (Fig. 14C1). Os alvos de miR-192-5p, por sua vez, estão exclusivamente envolvidos em ERBB2 e ERBB4 (Fig. 14C2), enquanto os alvos de miR-574-3p estão envolvidos exclusivamente em NTRKs (Fig. 14C3).

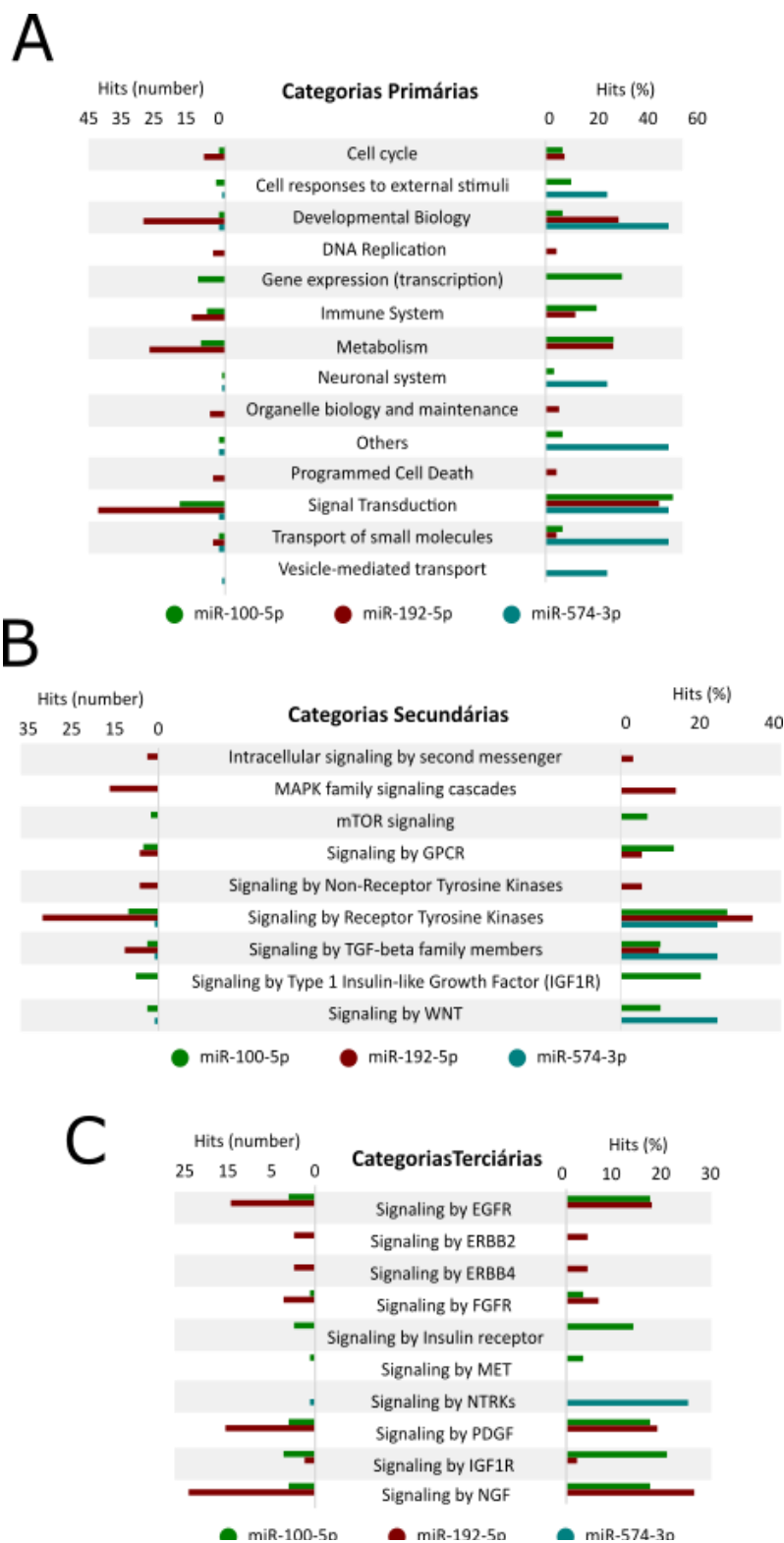


Figura 12 - Análise de enriquecimento de vias realizada para os miR-100-5p (verde), -192-5p (vermelho) e -574-3p (azul). (A) Categorias primárias (B) Categorias secundárias e (C) Categorias terciárias alteradas pelo grupo de genes preditos para cada miRNA. A coluna da esquerda é referente ao número de genes (hits) presente na determinada via, enquanto que a coluna da direita é a porcentagem de genes que está em determinada categoria com relação ao número total de genes (A), número total de genes na categoria primária relacionada (B) ou número total de genes na categoria secundária relacionada (C).

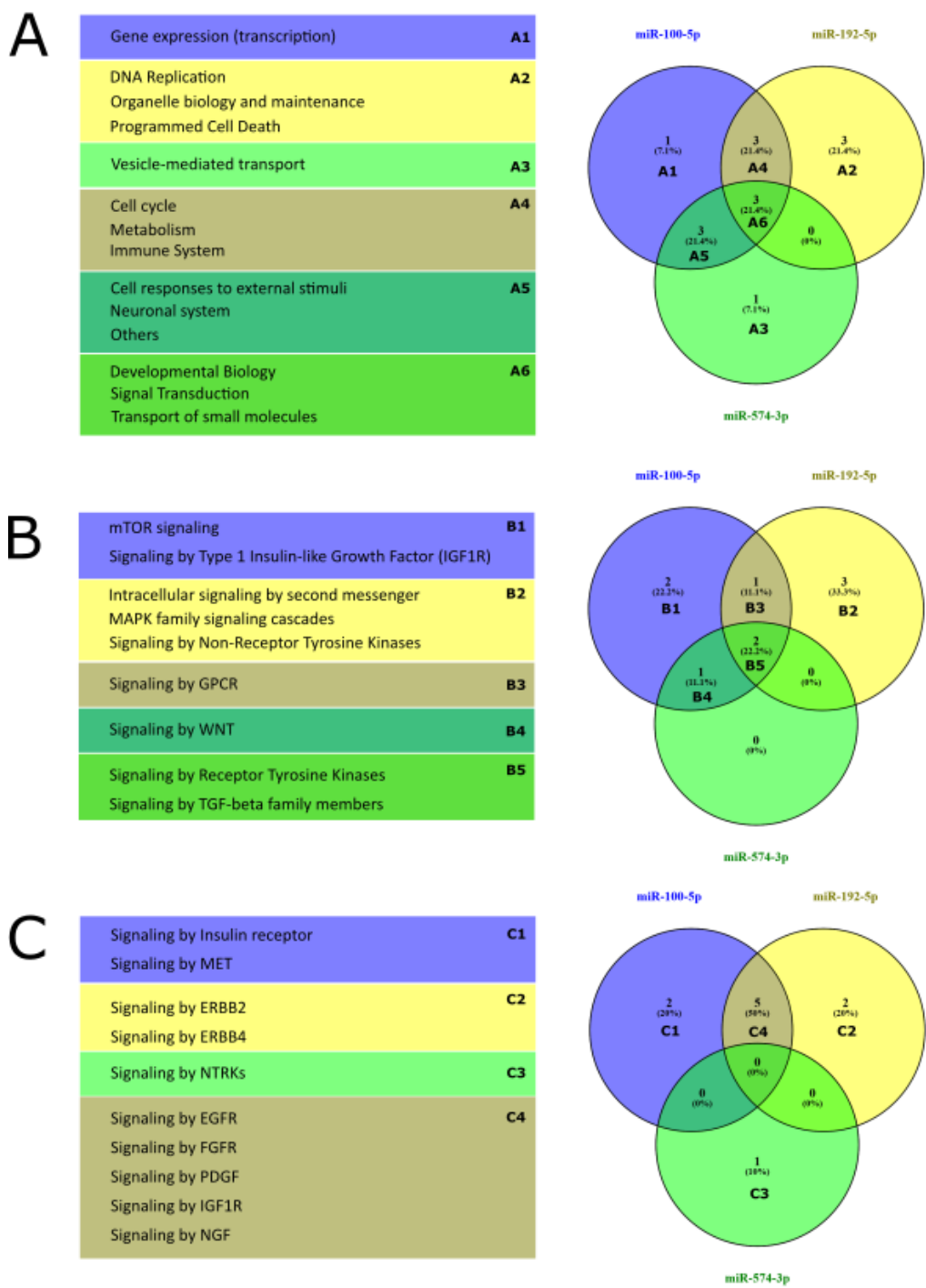


Figura 13 – Vias celulares possivelmente alteradas por genes alvos do miR-100-5p, -192-5p ou -574-3p, detectadas pelo Enriquecimento de vias *in silico*. (A) Categorias primárias, (B) secundárias ou (C) terciárias exclusivas ou comumente desreguladas pelos genes alvo.

Estes resultados preliminares resultantes do enriquecimento de via, nos forneceu um indício do que podemos esperar dos ensaios que serão realizados com os miRNAs selecionados, ou seja, quais parâmetros podem estar alterados, e se confirmados, quais genes podem estar relacionados diretamente aos miRNAs. Por exemplo, é esperado que, com relação aos demais, miR-100-5p tenha um maior envolvimento na regulação de sobrevivência celular (mTOR e IGF1R); miR-192-5p em proliferação e apoptose; e miR-574-3p em comunicação intercelular e produção de microvesículas. O significado biológico desta análise poderá ser elucidado de acordo com os próximos ensaios *in vitro* e os resultados obtidos com a hiperexpressão dos miRNAs selecionados.

### 2.2.5 Padronização do tratamento com miRNAs miméticos

Foram adquiridos miméticos de miRNAs para miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p comerciais, MISSION® microRNA Mimics (Sigma-Aldrich). Sua diluição foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. A transfecção celular foi realizada com o reagente

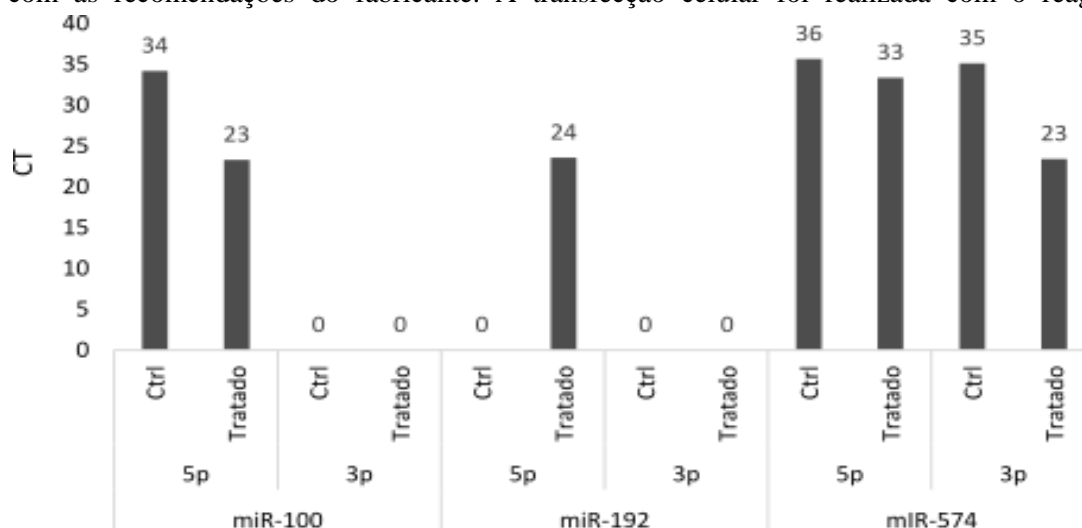


Figura 14 - Teste para amplificação de miRNAs alvo após o tratamento de células NP69 com 10pg de miméticos dos miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p. Pode-se verificar que quando a célula foi tratada com o mimético de miRNA, houve uma amplificação mais precocemente do respectivo miRNA de maneira específica.

Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), conforme as recomendações do fabricante. A dose selecionada foi posteriormente utilizada para um ensaio com os três miméticos com a linhagem NP69 para seleção dos genes alvo (Item 2.2.6.) que servirão para controle da transfecção dos experimentos *in vitro*.

Para a seleção da dose utilizada na transfecção, realizou-se uma curva que variou de 10 a 200 pmol por poço da placa de 24 poços, com a linhagem NP69. O plaqueamento de linhagem foi realizado conforme descrito previamente (Item 2.2.2.1). Observou-se que com o aumento da

---

dose, havia pouco incremento na inibição dos alvos selecionados, porém, havia um aumento ou inibição da expressão de outros alvos de modo inespecífico. Portanto, optou-se pela dose de 10 pmol.

Brevemente, para o tratamento, as células NP69 foram semeadas em placa de 24 poços na densidade de 60% ( $1 \times 10^5$  células/poço) e transfectadas com 10 pmol de miRNA mimético 24h após o plaqueamento. As células foram incubadas a 37°C em estufa úmida por 24h e então retiradas do poço utilizando o reagente para extração de RNA, Trizol® (Thermo Fisher Scientific). O ensaio foi realizado em duplicata técnica e triplicata biológica, sendo extraído RNA de um pool com proporções iguais de cada réplica técnica. A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante e as amostras foram então tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich) e o cDNA foi realizado de acordo com o recomendado pelo fabricante dos primers comerciais dos miRNAs (Canopy Biosciences, MO, USA), em um protocolo adaptado utilizando o High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). Para verificação do sucesso do tratamento com miméticos, as amostras de cDNA foram normalizadas para utilizar 30 ng por reação e foi realizado um RT-qPCR utilizando a enzima GoTaq (Promega) com a reação de 10 µL em duplicata técnica, respeitando protocolo de ciclagem e proporções de reação da enzima.

Para verificação do sucesso de amplificação dos primers, foi realizada uma reação com uma das replicatas biológicas. Este experimento visa verificar se a concentração do cDNA foi suficiente e se os componentes da reação estavam funcionando normalmente. Como o esperado, verificou-se uma redução no CT dos grupos tratados de modo específico (Fig. 15), ou seja, o primer comercial para miR-100-3p não amplificou a amostra de células tratadas com miR-100-5p. Na amplificação de células tratadas com o mimético do miR-100-5p e do miR-574-3p, o *fold change* foi 235 e 757 respectivamente. No entanto, para o miR-192-5p, não foi possível calcular o  $\Delta\Delta CT$ , pois não houve amplificação do miRNA no grupo não tratado (Reagente somente).

Nas próximas etapas serão testadas as concentrações de 50 e 100ng de cDNA por reação e será então realizada a amplificação das amostras provenientes do ensaio com miméticos em triplicata (descrito em item 2.2.6).

#### 2.2.6 Ensaio com genes alvo de miRNAs selecionados

Para que os ensaios com miméticos de miRNA tenham um controle da transfecção, serão utilizados dois métodos: a amplificação dos miRNAs selecionados por meio de primers comerciais (descrito em 2.2.5) e a detecção da inibição de um gene alvo predito, que será descrita a seguir. Os alvos são provenientes da predição computacional, descrita em item 2.2.4.

A seleção dos alvos a serem testados, baseou-se em determinados parâmetros. Estes deveriam estar entre os primeiros 1% dos genes (*TOP 1%*) com melhores scores de predição



(score  $\geq 0,38$ ) além de preferencialmente, a interação miRNA-alvo já ter sido descrita na literatura. Para tanto, foram testados os genes FZD8, mTOR, SMARCA5 e AGO2 para miR-100-5p, LPAR4, PRKAR1A, RAB2A e SEMA3A para miR-192-5p e CLTC, EP300, IL6, CUL2 e FBXL5 para miR-574-3p. Os controles endógenos testados foram RPS13, RRN18S e HSPCB.

Uma vez selecionados, os primers (Quadro 6) para PCR em tempo real (desenhados ou selecionados da literatura) foram sintetizados. Realizou-se uma curva de eficiência dos primers e somente aqueles com  $R^2 \geq 0,9$  foram utilizados. Para realização da curva de eficiência, foi utilizada uma diluição sequencial de 1:2 da amostra (NP69 sem tratamento), iniciando com 200ng de amostra para cada reação de RT-qPCR. Utilizamos para a reação a enzima GoTaq (Promega) com um volume final de 10 $\mu$ L, respeitando a ciclagem e as proporções da reação do fabricante.

Quadro 6 - Iniciadores e componentes da reação de qPCR para amplificação transcritos alvos selecionados por meio de análise computacional dos miR-100-5p, miR-192-5p e miR-574-3p.

Alvos e iniciadores	Eficiência (R <sup>2</sup> )	Inclusão no painel	Componentes da reação	Termociclagem
<b>miR-100-5p</b>			GoTaq® qPCR	95°C - 2 min (1x);
<u>AGO2</u>			Master Mix 2X,	95°C - 15s, 60°C -
S: 5' - CGCATCCATCTTCTACCGCGA - 3'	-	Não <sup>1</sup>	0,2 $\mu$ M	60s, 72°C - 30s
AS: 5' - TTGTCCCCGCTCGTTCTTG - 3'			iniciadores, Água	(40x); 60-95°C
<u>FZD8</u>			ultrapura livre de	(1x)
S: 5' - CCTCTTCATCGGCACCATGT - 3'	0,9983	Sim	nuclease (NF)	
AS: 5' - GGTGTAGAGCAGGTGAACA - 3'				
<u>mTOR</u> (Marinov et al., 2009)				
S: 5' - CTTAGAGGACAGCGGGAAG - 3'	-	Não <sup>1</sup>		
AS: 5' - TTGCTAGATGTGGTGGCAGC - 3'				
<u>SMARCA5</u>				
S: 5' - GGTCTTGCCATCAATCTTGCG - 3'	0,9898	Sim		
AS: 5' - CAAGCCTCCCATAGCCTGAA - 3'				
<b>miR-192-5p</b>				
<u>LPAR4</u> (MATAYOSHI et al., 2013)			GoTaq® qPCR	95°C - 2 min (1x);
S: 5' - CTCTTCGCAAGCCTGCTACT - 3'	0,9963	Sim	Master Mix 2X,	95°C - 15s, 60°C -
AS: 5' - GTTCAGAGTTGCAAGGCACA - 3'			0,2 $\mu$ M	60s, 72°C - 30s
<u>PRKAR1A</u> (Xie et al., 2015)			iniciadores, Água	(40x); 60-95°C
S: 5' - GTTTTCGGTCTCCTTTATCGC - 3'	0,9892	Sim	ultrapura livre de	(1x)
AS: 5' - TGCTCTCGGTGTTCCATAAATC - 3'			nuclease (NF)	
<u>RAB2A</u> (Luo et al., 2015)				
S: 5' - AGTTCGGTGCTCGAATGATAAC - 3'	0,9650	Sim		
AS: 5' - AATACGACCTTGATGGAACG - 3'				

Alvos e iniciadores	Eficiência (R2)	Inclusão no painel	Componentes da reação	Termociclagem
<b>SEMA3A</b>				
S: 5' - GTTTTCGCGGAACCGACTGC - 3'	-	Não <sup>1</sup>		
AS: 5' - TGTAAGGGAGCTGGGCAAC - 3'				
<b>miR-574-3p</b>				
<b>CLTC</b>				
S: 5' - TGCCATGCCCTATTCATCCA - 3'	0,9935	Sim	GoTaq® qPCR	95°C - 2 min (1x);
AS: 5' - CATCAACTGGGGCTGACCATA - 3'			Master Mix 2X, 0,2 µM	95°C - 15s, 60°C - 60s, 72°C - 30s
<b>CUL2</b>				
S: 5' - ATGTTCTACAGGCTGGTGCG - 3'	0,9989	Sim	iniciadores, Água ultrapura livre de nuclease (NF)	(40x); 60-95°C (1x)
AS: 5' - TCCTTCCACTGAAATGTTGGCT - 3'				
<b>EP300</b>				
S: 5' - CCGAGACATCTTGAGACGACAG - 3'	0,9007	Sim		
AS: 5' - GGGTTGCTGGAAGTGGTTATGG - 3'				
<b>FBXL5</b>				
S: 5' - AGCCTCTTTGAAAAGGGACTGA - 3'	0,9940	Sim		
AS: 5' - ACATGGGCTGAAAACCTCCT - 3'				
<b>IL6</b>				
S: 5' - GATGAGTACAAAAGTCCTGATCC - 3'	0,9490	Não <sup>2</sup>		
AS: 5' - ATTTGCCGAAGAGCCCTCAG - 3'				
<b>Controles endógenos</b>				
<b>HSPCB</b>				
S: 5' - TCTGGGTATCGGAAAGCAAGCC - 3'	0,9799	Sim	GoTaq® qPCR	95°C - 2 min (1x);
AS: 5' - GTGCACTTCCTCAGGCATCTTG - 3'			Master Mix 2X, 0,2 µM	95°C - 15s, 60°C - 60s, 72°C - 30s
<b>RPS13</b>				
S: 5' - CGAAAGCATCTTGAGAGGAACA - 3'	0,9986	Sim	iniciadores, Água ultrapura livre de nuclease (NF)	(40x); 60-95°C (1x)
AS: 5' - TCGAGCCCAACGGTGAATC - 3'				
<b>RRN18S</b>				
S: 5' - AGAAACGGCTACCACATCCA - 3'	0,9946	Sim		
AS: 5' - CACCAGACTTGCCCTCCA - 3'				

<sup>1</sup> Amplificação reduzida ou nula na linhagem NP69; <sup>2</sup> Curva de Melting com pico duplo

Os primers que tiveram uma amplificação robusta, com curva de melting em pico único e boa eficiência de amplificação foram utilizados em painel para verificar a presença da inibição do alvo por meio do tratamento com miméticos de miRNAs. O ensaio em triplicata realizado foi previamente descrito (Item 2.2.5) e as mesmas amostras utilizadas para amplificação dos miRNAs (Item 2.2.5) foram utilizadas para amplificação dos transcritos alvo. O painel de qPCR foi realizado em duplicata técnica e montado de maneira que todos os tratamento e triplicata estivessem na mesma placa, utilizando dois controles endógenos (RPS13 e RRN18S).

### 2.2.6.1 miR-100-5p

Dentre os alvos selecionados inicialmente (Quadro 6), foram testados como potenciais genes alvo para controle de reação, os transcritos dos genes FZD8 e SMARCA5. Os resultados mostraram que FZD8 é um marcador robusto para a verificação da ação de miR-100-5p (Fig. 16A), com uma redução de 40% (fold change: 0,6) enquanto que SMARCA5 não reduziu com o tratamento (Fig. 16B). É importante lembrar que os miRNAs nem sempre levam à clivagem de seu RNAm alvo, podendo ocorrer inibição da tradução proteica, sem que haja redução do transcrito.

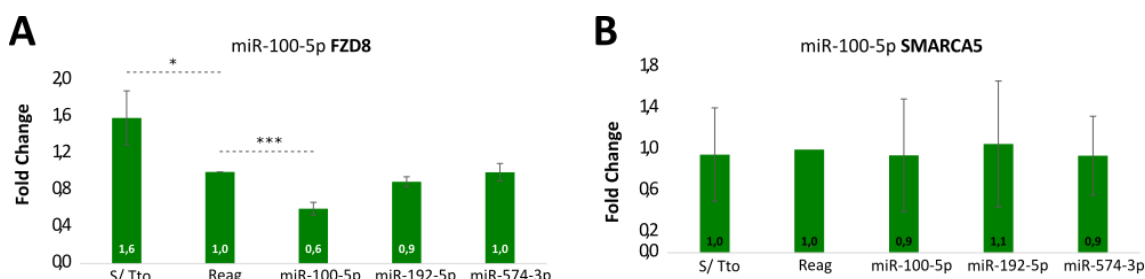


Figura 15 - Resultados de PCR em tempo real analisando os transcritos de genes alvo detectados para miR-100-5p em células imortalizadas de nasofaringe (NP69) sem tratamento, expostas ao reagente de transfecção ou transfectadas com miméticos de miR-100-5p, miR-192-5p e miR574-3p. (A) O tratamento com mimético de miR-100-5p levou à redução do transcrito de FZD8 e o reagente utilizado para transfecção também alterou a expressão deste gene. (B) Não houve alteração da expressão de SMARCA5 com o tratamento de nenhum dos miméticos. \* p<0,05; \*\*\* p<0,001.

### 2.2.6.2 miR-192-5p

Dentre os alvos selecionados inicialmente (Quadro 6), foram testados como potenciais genes alvo para controle de reação, os transcritos dos genes PRKAR1A e RAB2A. Os resultados mostraram que RAB2A é um marcador robusto para verificar a ação da hiperexpressão de miR-192-5p, com uma redução de 40% (fold change: 0,6) enquanto que PRKAR1A não reduziu com o tratamento e foi influenciado em grande parte pela presença do reagente, impossibilitando seu uso como controle.

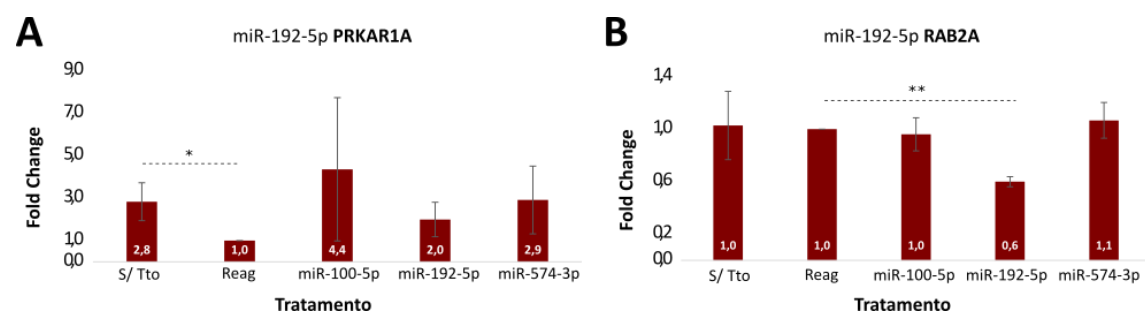


Figura 16 - Resultados de PCR em tempo real analisando os transcritos de genes alvo detectados para miR-192-5p em células imortalizadas de nasofaringe (NP69) sem tratamento, expostas ao reagente de transfecção ou transfectadas com miméticos de miR-100-5p, miR-192-5p e miR574-3p. (A) Não houve alteração da expressão de PRKAR1A com o tratamento de nenhum dos miméticos e o transcrito foi marcadamente alterado pelo tratamento com o reagente de transfecção. (B) O tratamento com mimético de miR-192-5p levou à redução específica do transcrito de RAB2A. \* p<0,05; \*\* p<0,01.

### 2.2.6.3 miR-574-3p

Dentre os alvos selecionados inicialmente (Quadro 6), foram testados como potenciais genes alvo para controle de reação, os transcritos dos genes CLTC, CUL2, EP300 e FBXL5. Os resultados mostraram que nenhum dos genes testados deveria ser utilizado como marcador de reação. Vale ressaltar que diferentemente dos miR-100-5p e miR-192-5p, os alvos de miR-574-3p possuíam um escore de predição abaixo de 0,6 (sendo 1 o valor ideal) e este possuía apenas 10 genes preditos. No momento, foram selecionados outros genes alvo para teste e os primers serão sintetizados para teste.

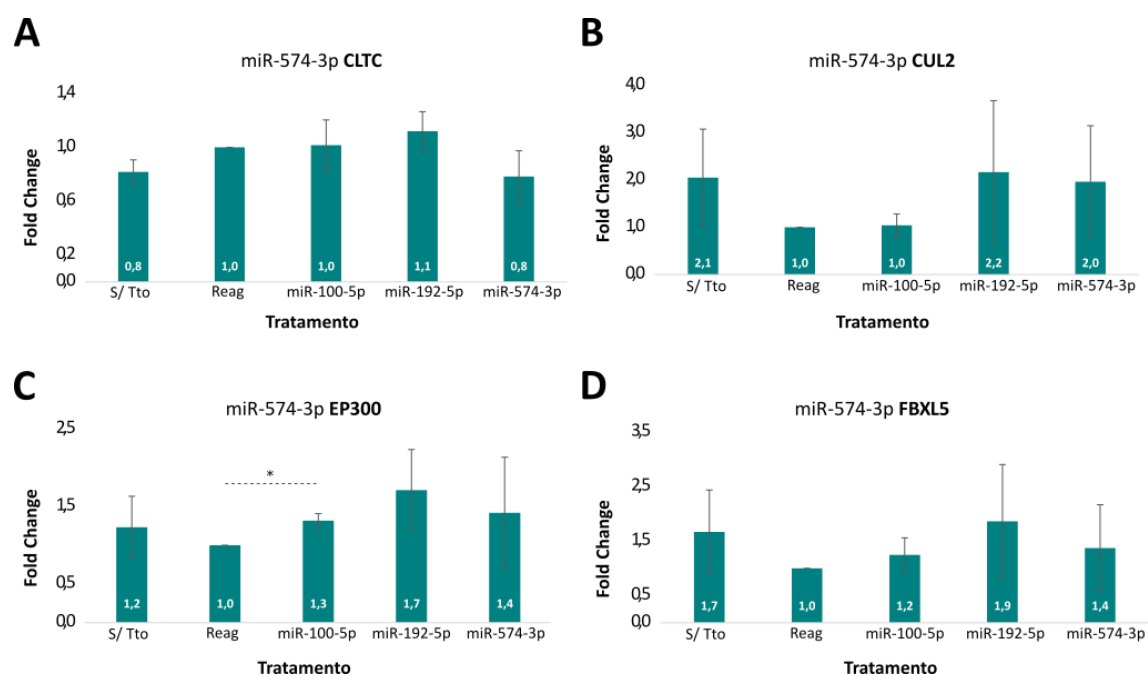


Figura 17 - Resultados de PCR em tempo real analisando os transcritos de genes alvo detectados para miR-574-3p em células imortalizadas de nasofaringe (NP69) sem tratamento, expostas ao reagente de transfecção ou transfectadas com miméticos de miR-100-5p, miR-192-5p e miR574-3p. (A) Não houve alteração da expressão de (A) CLTC, (B) CUL2 e (D) FBXL5. (C) A expressão de EP300 teve um aumento quando as células foram tratadas com mimético de miR-100-5p e não alterou com os demais tratamentos. \*  $p < 0,05$ .

## 3 Seguimento do estudo

Com a finalização da seleção de genes alvo, será realizada nova transfecção para realização dos ensaios de migração, invasão, proliferação e apoptose celular *in vitro*, tendo então os resultados obtidos provenientes da hiperexpressão por meio de miméticos dos miRNAs selecionados.

Adicionalmente, estão sendo estabelecidos os plasmídeos para hiperexpressão constitutiva dos miRNAs selecionados (miR-100, miR-192 e miR-574) passível de modulação pelo tratamento com tetraciclina. Para validação destes vetores, será utilizada RT-qPCR para amplificação dos genes alvo previamente selecionados e dos miRNAs (primers comerciais descritos em item 2.2.5) além de um plasmídeo para ensaio da luciferase (sendo estabelecido

---

---

concomitantemente). Com isso, poderemos observar se o vetor de shRNA está sendo expresso, modular sua expressão por meio do vetor de regulação (responsivo a tetraciclinas), se uma ou ambas as fitas irmãs de cada miRNA está sendo expressa (5p e/ou 3p) e se sua função está preservada.

Uma vez estabelecidos os vetores, serão realizados o restante dos ensaios *in vitro*: ensaio de formação de colônia e ensaio de detecção de células tronco cancerígenas. Após o término da coleta dos resultados dos ensaios *in vitro*, serão iniciados os ensaios *in vivo*, com o modelo *zebrafish*.

## 4 Cronograma atualizado

Atividades	Ano 1			Ano 2			Ano 3			Ano 4		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Cursando disciplinas	○	○	○	●	●							
Geração das linhagens celulares	○	○	○									
Padronização dos tratamentos			○									
Relatório Parcial 1			○									
Ensaio de migração e invasão celular <i>in vitro</i>				●	●	●						
Estágio de docência				○	●	●						
Ensaio de clonogenicidade celular <i>in vitro</i>					●	●						
Caracterização das células tronco cancerígenas						●	●					
Relatório Parcial 2						●						
Estabelecimento dos embriões de zebrafish GFP positivos						●	●	●				
Ensaio de angiogênese <i>in vivo</i>								●	●	●		
Ensaio de taxa de metástase <i>in vivo</i>								●	●	●		
Relatório Parcial 3												
Compilação e análise de resultados. Experimentos adicionais requeridos											●	
Redação da dissertação e defesa da tese de doutorado. Submissão de relatório final.												●

## 5 Outras atividades

As demais atividades cursadas, como artigos publicados, pôsteres, palestras e simpósios visitados estão presentes no anexo Súmula Curricular.

Durante este período finalizei o artigo proveniente do projeto desenvolvido durante o mestrado e este está sendo revisado pelos co-autores do trabalho. Após os últimos ajustes será enviado para a revista *Virology* (fator de impacto: 3,37).

---

***“Latent membrane protein 1 (LMP1) from Epstein-Barr virus (EBV) strains M81 and B95.8 modulate miRNAs expression when expressed in immortalized human nasopharyngeal cells”***

Short title: LMP1 from EBV M81 and B95.8 affect different miRNAs expression and pathway modulation

Authors' names: Barbara G. MÜLLER-COAN1, Ethel CESARMAN2, Marcio Luis ACENCIO3, Deilson ELGUI DE OLIVEIRA1,4

**Author's addresses:**

1. São Paulo State University (UNESP), Medical School of Botucatu.

Mail address: Av. Prof. Mário Rubens G. Montenegro, s/n. CEP 18618-687 - Botucatu, SP, Brazil

2. Weill Cornell Medical College, Department of Pathology and Laboratory Medicine.

Mail address: 1300 York Avenue, Room C410B. New York, NY 10021

3. Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Department of Cancer Research and Molecular Medicine.

Mail address:

4. São Paulo State University (UNESP), Institute of Biotechnology (IBTEC)

Mail address: Alameda das Tecomarias, s/n. CEP 18607-440 - Botucatu, SP, Brazil.

**Corresponding author**

Elgui de Oliveira, D (elgui@virican.net)

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Depto. Patologia

Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n.

CEP 18618-687 - Botucatu, SP, Brasil

Proposed subheading: Viral Pathogenesis

**Abstract**

The Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous gammaherpesvirus strongly associated with nasopharyngeal carcinomas. The EBV oncogenicity is partially explained by hijacking of intracellular signaling pathways, a potential effect of viral latent membrane protein 1 (LMP1) regulation of cellular microRNAs (miRNAs). EBV strains M81 and B95.8 differ in cell tropism and induction of lytic cycle. On the other hand, eventual peculiarities regarding the activities of their LMP1 remains to be fully characterized. This study aimed to assess the effects of LMP1 from EBV strains M81 and B95.8 when expressed in the NP69 immortalized cell line, derived from human nasopharyngeal epithelium. A qPCR array of 91 selected miRNAs showed that comparing LMP1 variants B95.8 and M81, the latter caused higher levels of miR-100-5p, miR-192-5p, and miR-574-3p when expressing in NP69 cells. The cells expressing either LMP1 variant behave similarly in terms of NF- $\kappa$ B activation and migration. However, in silico pathway enrichment analysis indicated that LMP1 M81 putatively causes distinct regulation of genes involved in cell cycle (i.e. NUP50 and RB1), mRNA processing (i.e. NUP50) and mitochondrial biogenesis and maintenance (i.e. ATF2). Furthermore, we observed a different set of miRNAs regulated when comparing EBV LMP1 M81 to B95.8, indicating that M81 more directly regulates genes implicated in the programmed cell death pathway, such as APPL1, CYCS, DCC, and XIAP.

---

In conclusion, EBV LMP1 from strains M81 and B95.8 behave distinctly regarding miRNA regulation. Also, results obtained after in silico analysis provided valuable clues to dissect the molecular effects in cells expressing the viral LMP1 of these viral strains, relevant to discriminate their distinct biological and pathogenetic features.

Keywords: Epstein-Barr virus, LMP1, microRNAs, nasopharyngeal carcinoma cells

## 6 Referências

- Croft, D., Mundo, A.F., Haw, R., Milacic, M., Weiser, J., Wu, G., Caudy, M., Garapati, P., Gillespie, M., Kamdar, M.R., et al. (2014). The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 42, D472–D477.
- Li, H.M., Man, C., Jin, Y., Deng, W., Yip, Y.L., Feng, H.C., Cheung, Y.C., Lo, K.W., Meltzer, P.S., Wu, Z.G., et al. (2006). Molecular and cytogenetic changes involved in the immortalization of nasopharyngeal epithelial cells by telomerase. *Int. J. Cancer* 119, 1567–1576.
- Luo, M.-L., Gong, C., Chen, C.-H., Hu, H., Huang, P., Zheng, M., Yao, Y., Wei, S., Wulf, G., Lieberman, J., et al. (2015). The Rab2A GTPase Promotes Breast Cancer Stem Cells and Tumorigenesis via Erk Signaling Activation. *Cell Rep.* 11, 111–124.
- Marinov, M., Ziogas, A., Pardo, O.E., Tan, L.T., Dhillon, T., Mauri, F.A., Lane, H.A., Lemoine, N.R., Zangemeister-Wittke, U., Seckl, M.J., et al. (2009). AKT/mTOR Pathway Activation and BCL-2 Family Proteins Modulate the Sensitivity of Human Small Cell Lung Cancer Cells to RAD001. *Clin. Cancer Res.* 15, 1277–1287.
- MATAYOSHI, S., CHIBA, S., LIN, Y., ARAKAKI, K., MATSUMOTO, H., NAKANISHI, T., SUZUKI, M., and KATO, S. (2013). Lysophosphatidic acid receptor 4 signaling potentially modulates malignant behavior in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 42, 1560–1568.
- Schagat, T., and Vidugiriene, J. (2008). MicroRNA Biosensors: Application for the psiCHECK™-2 Vector. Promega Corp.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504.
- Shirdel, E.A., Xie, W., Mak, T.W., and Jurisica, I. (2011). NAViGaTing the Micronome – Using Multiple MicroRNA Prediction Databases to Identify Signalling Pathway-Associated MicroRNAs. *PLOS ONE* 6, e17429.
- Tokar, T., Pastrello, C., Rossos, A.E.M., Abovsky, M., Hauschild, A.-C., Tsay, M., Lu, R., and Jurisica, I. (2018). mirDIP 4.1—integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res.* 46, D360–D370.
- Xie, K., Ma, H., Liang, C., Wang, C., Qin, N., Shen, W., Gu, Y., Yan, C., Zhang, K., Dai, N., et al. (2015). A functional variant in miR-155 regulation region contributes to lung cancer risk and survival. *Oncotarget* 6, 42781–42792.