

Papel dos genes latentes do vírus Epstein-Barr na oncogênese

Role of the latent genes of Epstein-Barr virus in the oncogenesis

Marcos Antonio Pereira de Lima ¹, Sílvia Helena Barem Rabenhorst ², PhD

¹Mestre de Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina, Campus Cariri, Universidade Federal do Ceará. ² Professora Doutora de Genética Molecular do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina, Campus Porangabaçu, Universidade Federal do Ceará.

Resumo

O Vírus Epstein-Barr (EBV) é amplamente distribuído no mundo, sendo estimado que mais de 90% da população adulta esteja infectada e que a maioria desses indivíduos transmita intermitentemente o vírus através da saliva. Além da associação com algumas doenças benignas, tais como mononucleose infecciosa, leucoplasia pilosa e doença linfoproliferativa pós-transplante, o EBV também tem sido associado a diversas neoplasias como linfoma de Burkitt, Doença de Hodgkin, carcinoma de nasofaringe, carcinoma gástrico, entre outros. Nas células tumorais, o referido vírus se apresenta no estado latente, podendo expressar alguns dos treze genes latentes, dependendo do tecido e do estado imunológico do hospedeiro. Apesar da vasta literatura acerca dos expressos latentes, os mecanismos envolvidos na oncogênese dos diversos tecidos ainda não estão totalmente esclarecidos. Nesse cenário, o presente artigo faz uma revisão acerca dos expressos latentes do EBV, abordando os padrões de latência observados nos cânceres associados, características estruturais e os efeitos descritos para cada expresso, com enfoque no papel oncogênico.

Palavras-chave: vírus Epstein-Barr – genes latentes – oncogênese.

Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) is widely distributed around the world, being estimated that more than 90% of the adult population is infected and that the majority transmits intermittently by the saliva. Besides the association with some benign diseases such as infectious mononucleosis, hairy leukoplakia, and post-transplant lymphoproliferative disorder, EBV has also been associated with several tumors such as Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease, nasopharyngeal carcinoma, gastric carcinoma and others. In the tumor cells, the referred virus displays a latent status, in which it is able to express some of the thirteen latent genes depending of the tissue and host immunologic status. Despite the wide literature about the latent transcripts, the involved mechanisms are still not completely elucidated. In this scenario, this paper reviews the major data about EBV latent transcripts, pointing the latent patterns observed in the associated tumors, structural features and the reported effects for each transcript, with focus on the oncogenic role.

Keywords: Epstein-Barr virus- Latent genes - Oncogenesis.

INTRODUÇÃO

Vírus Epstein-Barr (EBV) é amplamente distribuído na população e, apesar de sua infecção passar despercebida na maioria dos indivíduos, ele é apontado como agente etiológico em alguns tipos de câncer. O EBV é um Gama-*Herpesvirus* que mede aproximadamente 150nm de diâmetro, constituído de DNA linear fita dupla com cerca de 172Kpb, circundado por um capsídeo icosadeltaédrico formado por 162 capsômeros e revestido por um envoltório glicoprotéico. ^{1,2}

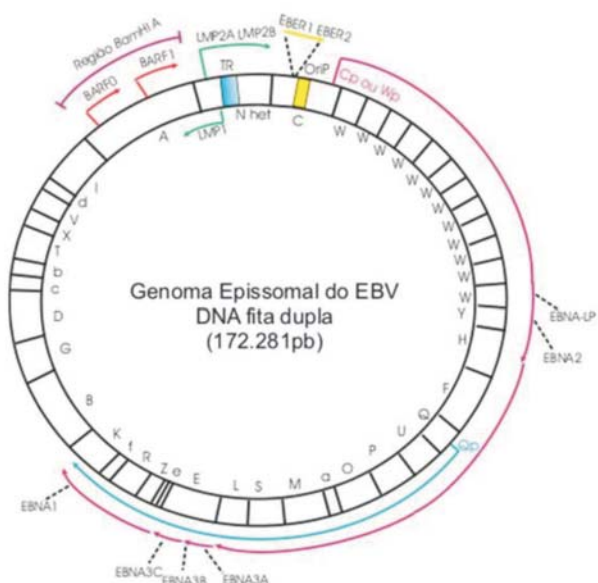
O mapa genômico clássico do EBV foi definido pela ação da endonuclease *Bam*HI, e as regiões foram nomeadas em ordem alfabética de acordo com o tamanho, sendo o fragmento *Bam*HI-A o maior entre eles ³. Foi verificado que o genoma viral apresenta regiões de repetição, cuja função ainda não está esclarecida. Ambas as extremidades da forma linear do genoma viral

apresentam sequências de repetição de 500pb, denominadas repetição terminal (TR), onde ocorre a ligação das extremidades durante o processo de circularização no interior das células infectadas (FIGURA 1). Foi demonstrado, posteriormente, que, na região *Bam*HI-C, está localizada uma sequência denominada OriP (**O**rigem da **R**eplicação **P**lasmidial), a qual contém dois elementos chamados de: FR (**F**amily of **R**epeats), que inclui 20 repetições de 30pb em sequência, e DS (**D**yad **S**ymmetry), constituído de 4 repetições ^{1,4}.

A transmissão do EBV é mediada através da saliva, por meio de beijos e perdigotos. Inicialmente, infecta células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares, sendo replicado nessas células ⁵. Posteriormente, os vírus disseminam-se para tecidos linfóides subjacentes, infectando linfócitos B, que representam o principal reservatório viral. Alguns autores sugerem que, durante a infecção primária, os vírus presentes na saliva podem também penetrar nas criptas de estruturas linfoepiteliais, tais como as tonsilas, atravessando uma fina camada superficial de

Recebido em 08 de outubro de 2009; revisado em 01 de junho de 2010.
Correspondência / Correspondence: Marcos Antonio Pereira de Lima.
Rua Divino Salvador, 284 - Bairro Rosário. 63180-000, Barbalha (CE),
Brasil. Tel.: (88) 3312-5000 / 8812-2688 . E-mail: marcosantonio@ufc.br

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do vírus Epstein-Barr (EBV).



Nota: As regiões do genoma determinadas pelo sítio de restrição da enzima *Bam*HI são representadas pelas letras dispostas no interior do círculo; a origem da replicação plasmidial (OriP) é demonstrada em amarelo; a sequência de repetição terminal (TR) é demonstrada em azul; a seta cor-de-rosa representa o longo transcrito produzido a partir do promotor Cp ou Wp durante a latência tipo III, que é submetido a diversos *splices* para codificar todos os EBNA's; a seta azul representa o transcrito do EBNA1, produzido a partir do promotor Qp durante as latências I e II; as demais setas coloridas, representam o sentido e a origem da transcrição dos genes latentes do EBV (Adaptado de Murray e Young ²²).

células epiteliais para alcançar diretamente os linfócitos subjacentes ⁶. Nos linfócitos, a penetração é viabilizada pela fusão do envoltório com a membrana celular, mediada pela ligação da gp350/220 ao receptor CD21 (ou CR2), auxiliada pela interação das glicoproteínas gp25 (gpL), gp42/38 e gp85 (gpH), ao MHC-II ⁷. No citoplasma, o capsídeo é desnudado e o genoma viral, antes linear, torna-se imediatamente circular, sendo então transportado para o núcleo onde permanece sob a forma de DNA episossomal extracromossômico ^{1,2}.

No estado episossomal, o vírus é descrito como *latente*, sendo replicado apenas durante a mitose da célula hospedeira. Apesar de seu genoma ser capaz de codificar cerca de 100 genes, pode-se verificar a expressão de até 13 genes, dependendo do tipo celular e (ou) estado imunológico do hospedeiro. Os produtos desses genes latentes incluem: seis proteínas conhecidas como antígenos nucleares do EBV (*Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen*), EBNA-1, 2, 3A, 3B (EBNA4), 3C (EBNA6) e LP (*Leader Protein*, também conhecida como EBNA5); três proteínas latentes de membrana (*Latent Membrane Protein*) LMP-1, LMP-2A e LMP-2B; duas pequenas moléculas de RNA, EBER-1 e -2 (*Epstein-Barr Virus Encoded RNA*); transcritos com múltiplos *splices*, da região *Bam*HI-A, BARFO (*Bam*HI A *Right-ward Open Reading Frame*) e BARF1 ⁸. Sabe-se que linfócitos B primários infectados pelo EBV *in vitro* tornam-se imortalizados, assumindo um fenótipo denominado de linhagem celular linfoblastóide (LCL), com potencial proliferativo ilimitado. Esse padrão, caracterizado pela expressão de 12 genes latentes, também é verificado na doença linfoproliferativa pós-transplante (DLPT) em pacientes imunossuprimidos, apontando para a importância da vigilância imunológica no controle dos efeitos oncogênicos do EBV.

Diante das diferenças de expressão de genes latentes observadas em diversos tipos celulares, foi proposta a existência de quatro tipos de latência com padrões distintos de expressão (QUADRO 1). Nos linfócitos B inicialmente infectados, o EBV desenvolve uma infecção latente, com a expressão do padrão completo de genes característico da latência do tipo III. Após o controle da infecção inicial, promovido principalmente por linfócitos T CD8+, o número de linfócitos B infectados reduz significativamente, de cerca de 10.000 células para uma célula infectada por milhão de células-B circulantes ⁹. Também é possível verificar uma mudança no padrão de expressão de proteínas latentes, assumindo o padrão de latência do tipo IV, caracterizado por uma mínima expressão de genes latentes, o que possivelmente contribui para o escape ao sistema imune ².

Quadro 1 - Expressão de genes latentes quanto aos tipos de latência e células infectadas.

LATÊNCIA	EXPRESSOS VIRAIS												TIPO CELULAR
	EBNA-1	-2	-3A	-3B	-3C	LP	LMP1	LMP2A	LMP2B	EBERs	BARFO	BARF1	
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Linfoma de Burkitt
	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	Carcinoma Gástrico
	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Carcinoma de Nasofaringe
	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	DH; Linfoma de células T
III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	DLPT; Linfoma-AIDS *
IV	+/-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Linfócitos B circulantes**

Nota: DH = Doença de Hodgkin; DLPT = Doença Linfoproliferativa Pós-transplante; * Linfoma não-Hodgkin associado a AIDS; ** Linfócitos B circulantes de indivíduos saudáveis portadores (Cf. referências 22 e 50)

Os avanços das técnicas imunológicas e moleculares de detecção viral têm possibilitado compreender melhor o papel do EBV em diversas doenças associadas, assim como verificar novas associações. Atualmente, sabe-se que o EBV é encontrado em linfoma de Burkitt, Doença de Hodgkin, carcinoma de nasofaringe, linfomas de células T, linfomas/leucemias de células NK (*Natural killers*), leucoplasia pilosa e carcinoma gástrico. Ademais, vários autores têm demonstrado a presença do genoma viral em diversos tipos de tumores sólidos, como revisado por Lima e Rabenhorst¹⁰. No presente artigo, fazemos uma revisão acerca da biologia do EBV e do papel tumorigênico de seus principais genes latentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desta revisão, utilizamos artigos de periódicos científicos disponíveis nos portais eletrônicos “Pubmed” e “Periódicos Capes”.

Papel dos Expressos Latentes do EBV

Atualmente, de acordo com a *International Agency for Research on Cancer*, o EBV é classificado como um agente carcinógeno do grupo I¹¹. Embora os mecanismos oncogênicos do EBV ainda não estejam totalmente esclarecidos, tem sido sugerida uma relação com a expressão de seus genes latentes, que podem atuar sobre mecanismos de proliferação e morte celular. Estão relacionados a seguir os genes latentes virais e os efeitos observados sobre os mecanismos celulares.

EBNA1

O EBNA1 é uma proteína de ligação a DNA, constituída de 641 aminoácidos, codificada a partir do gene BKRF1¹. É expresso nos três primeiros tipos de latência, indicando a sua importância na infecção latente. Tem demonstrado ser essencial na segregação do genoma viral durante a divisão das células hospedeiras, promovendo a sua manutenção nas células-filha^{7,12,13,14}. Esse processo é mediado por meio da ligação dessa proteína à região OriP¹⁵. Alguns autores relatam que a ligação do EBNA1 à sequência FR da região OriP promove a ativação de vários promotores, dentre eles o Cp^{4,12}. Pode ainda se ligar a duas regiões do promotor Qp, a partir do qual é transcrito nos dois primeiros tipos de latência, regulando negativamente sua própria expressão¹³. A ligação da proteína ao DNA ocorre mediante o domínio carboxi-terminal (aminoácidos 459-487) a uma sequência consenso palindrômica: TAGCATATGCTA¹⁶.

Uma característica do EBNA1 é que sofre homodimerização, sendo esse um evento necessário para o sucesso da ligação ao DNA¹⁷. A maior parte da região amino-terminal do EBNA1 é composta pela repetição de glicina-alanina (GAR). Tem sido demonstrado que essa repetição inibe degradação proteolítica realizada pelo proteossomo, de modo que,

os epítomos não são processados e apresentados na superfície celular em MHC-I¹⁸. Esse mecanismo, além de prolongar a meia-vida da proteína, pode contribuir no desenvolvimento de neoplasias, uma vez que as células infectadas conseguem evadir-se do controle do sistema imune, particularmente de linfócitos T CD8 citotóxicos.

A principal evidência do papel tumorigênico do EBNA1 decorre do estudo de Wilson, Bell e Levine¹⁹, que verificaram o desenvolvimento de linfoma de células B em camundongos transgênicos expressando EBNA1. Drotar e colaboradores²⁰ relataram que o EBNA1 pode contribuir na superexpressão de *c-MYC*, particularmente na translocação cromossômica entre o *locus* do *c-MYC* e o *locus* da cadeia leve ou pesada de imunoglobulina, favorecendo o desenvolvimento de linfoma. EBNA1 também promove instabilidade genômica em linfócitos B pela produção de espécies reativas do oxigênio²¹. Outras funções atribuídas ao EBNA1 incluem ligação à RNA e regulação do promotor do gene LMP1.^{12,22}

EBNA2

O EBNA2 é uma proteína que atua como fator transcricional de genes virais e celulares. É codificado pelo gene BYRF1 e apresenta-se sob duas formas alélicas, EBNA2A e EBNA2B, que distinguem os dois subtipos virais: EBV tipo 1 e 2¹⁴. O EBNA2A é constituído de 483 aminoácidos, enquanto que o EBNA2B contém 455. Ambas são essenciais para a imortalização de linfócitos-B, embora o EBNA2B demonstre uma capacidade reduzida.²³

O EBNA2 e o EBNA-LP são as primeiras proteínas virais a serem detectadas na infecção primária de linfócitos-B. Juntas, induzem a expressão de ciclina D2, um marcador da fase G1 do ciclo celular, promovendo a transição da fase G0 para G1 em linfócitos-B em repouso²⁴. O EBNA2 transativa os genes *CD21*, *CD23* (marcadores de ativação linfocítica), *c-fgr* (codificador de uma proteína-quinase, membro da família src) e o proto-oncogene *c-MYC*, um evento que provavelmente contribui para a proliferação de linfócitos-B^{7,13}. Não obstante, o EBNA2 também transativa a LMP1, LMP2A e se liga ao promotor Cp^{12,14}. Uma das evidências mais expressivas da relevância do EBNA2 na transformação celular provém da incapacidade da cepa viral P3HR-1, que apresenta deleção do gene EBNA2 e dos dois últimos exons do EBNA-LP, de induzir transformação de linfócitos B *in vitro*.²⁵

O EBNA2 pode transativar genes por meio da combinação com um fator transcricional RBP-Jk (também conhecido como CBF-1). Esse fator está envolvido na via de sinalização Notch, relacionada com a determinação do destino celular, a qual tem sido associada ao desenvolvimento de linfomas de células T em humanos²⁶. Assim, o EBNA2 compartilha homologia funcional com o componente Notch1 IC, por transativar genes ao se ligar a RBP-Jk.⁷

Família EBNA3

Essa família é constituída por três proteínas: EBNA3A, EBNA3B (EBNA4) e EBNA3C (EBNA6)^{27,28}. Tem sido demonstrado que as proteínas EBNA3A e -3C são fundamentais na transformação de linfócitos B *in vitro*, enquanto que a participação do EBNA3B parece ser dispensável²⁵. O EBNA3C pode induzir a expressão de genes virais (LMP1) e celulares (*CD21*) e suprimir o promotor Cp²². Pode também se ligar a pRb, liberando os fatores de transcrição E2F, responsáveis pela ativação de diversos genes importantes para a progressão do ciclo celular²⁹. Essa mesma região do EBNA3C também interage com as proteínas p27 e c-Myc, aumentando, nessa última, a estabilidade e a transativação de seus alvos gênicos³⁰. Yi e colaboradores³¹ também demonstraram interação com a p53, levando ao bloqueio de sua atividade transcricional e apoptótica.

Foi verificado ainda que as três proteínas dessa família são capazes de se ligar à RBP-Jk, impedindo sua interação com outras proteínas e o DNA, suprimindo a expressão de genes mediada pela via Notch, ou mediante o EBNA2^{7,13,26}. Destarte, as proteínas EBNA2 e a família EBNA3 devem atuar no balanço da atividade do RBP-Jk. Além disso, as proteínas EBNA3 devem promover um mecanismo de *feedback* negativo, ao impedir os efeitos mediados pelo EBNA2, ao passo que essa última não irá ativar o promotor Cp, resultando na inibição da expressão das próprias proteínas EBNA3²⁶.

EBNA-LP

O EBNA-LP (ou EBNA5) é codificado pela sequência líder do longo transcrito viral que dá origem aos EBNA's, sendo por essa razão denominado LP (*leader protein*). O tamanho dessa proteína é variável, dependendo do número de repetições do fragmento BamHI-W de cada isolado viral²². Tem sido demonstrado que a sua expressão parece ser prescindível na transformação de células B *in vitro*, sendo, no entanto, importante na proliferação de linhagens celulares linfoblastóides (LCL)¹³. Ademais, estudos bioquímicos *in vitro* verificaram que o EBNA-LP liga-se às proteínas p53 e pRb. No entanto, diferentemente de proteínas de outros vírus, não foram observadas alterações nas vias de sinalização de ambas oncoproteínas celulares.³²

LMP1

A proteína LMP1 é codificada pelo gene BNLF1, sendo o único dentre os genes latentes a ser transcrito para a esquerda, de acordo com o mapa de restrição (FIGURA 1). É constituída de 386 aminoácidos, apresentando um curto domínio citoplasmático amino-terminal (23 aminoácidos) e um longo domínio citoplasmático carboxi-terminal (200 aminoácidos), intercalados por seis domínios transmembranais³³. Análises da sequência do gene revelaram a ocorrência de uma

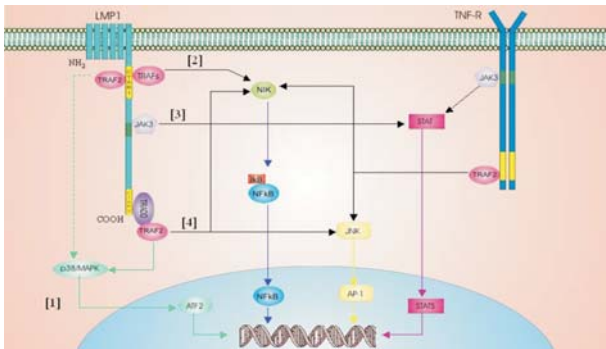
deleção de 30pb entre os nucleotídeos 168256-168285, que codifica uma região próxima à extremidade carboxi-terminal. Tem sido sugerido que as cepas que apresentam essa deleção exercem um potencial oncogênico mais elevado. Não obstante, foi verificado que a deleção ocorre frequentemente em cepas de EBV-1.^{12,34}

O domínio carboxi-terminal da LMP1 apresenta uma homologia funcional com receptores da família do fator de necrose tumoral (TNFR), tal como o CD40, que interagem com moléculas transdutoras de sinais chamadas de fatores associados a receptores de TNF (TRAF)³⁵. Esses fatores compreendem uma família de proteínas, que se ligam em regiões específicas dos TNFR que contenham sequências de aminoácidos prolina-x-glicina-x-treonina (PxQxT)⁶. Na LMP1, esses fatores, especialmente o TRAF2, se ligam às regiões C-terminal de ativação (CTAR)-1 e -2, as quais contêm sequências PxQxT (FIGURA 2). Essa ligação determina a ativação do Fator Nuclear-kB (NF-kB), possivelmente mediante a ativação da NIK (NF-kB-inducing kinase), que promove a fosforilação e subsequente degradação proteolítica do inibidor Iκ-Bα, liberando o NF-kB para migrar até o núcleo, onde atua como fator transcricional^{33,36}. A região CTAR2 é responsável pela maior parte do NF-kB ativado pela LMP1²⁵. Todavia, a ativação do NF-kB por meio da CTAR2 é mediada essencialmente pela interação com o TRADD (*TNF-Receptor Associated Death Domain*), seguida da interação com o TRAF2. Normalmente, a proteína TRADD está envolvida em sinais de morte celular, mas, no caso da LMP-1, isso não é verificado.²²

Do ponto de vista funcional, existem algumas diferenças entre a LMP1 e o receptor CD40: 1ª.) a interação com TRAF6 não é observada na proteína viral; 2ª.) a associação do CD40 e outros membros da família TNFR com os TRAF é mediada por meio da interação com ligantes específicos na porção extracelular do receptor, enquanto que a LMP1 é constitutivamente ativada independente de ligante, sendo essa ativação atribuída à agregação de LMP1 na membrana plasmática.^{6,33}

A LMP1 está associada a, pelo menos, três outras vias de sinalização independentes, que, juntas, contribuem no desenvolvimento dos efeitos atribuídos à presença da proteína viral em questão. Essas vias incluem a ativação dos STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), por meio da interação da JAK3 (*Janus-activated kinase 3*) com uma sequência rica em prolina situada entre as regiões CTAR1 e CTAR2²⁵. Inclui também a ativação do AP-1 (*Activator Protein 1*) por meio da interação da JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*, ou proteino-quinase ativada por estresse – SAPK) com o TRAF2 na CTAR2³⁷. Por fim, a via da proteino-quinase ativada pelo mitógeno p38 (p38/MAPK), mediada pela interação do TRAF2 com as regiões CTAR1 e 2. Essa última via está relacionada com a indução da secreção de IL-6 e IL-8.³⁸

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da LMP1 e as vias de sinalização envolvidas.

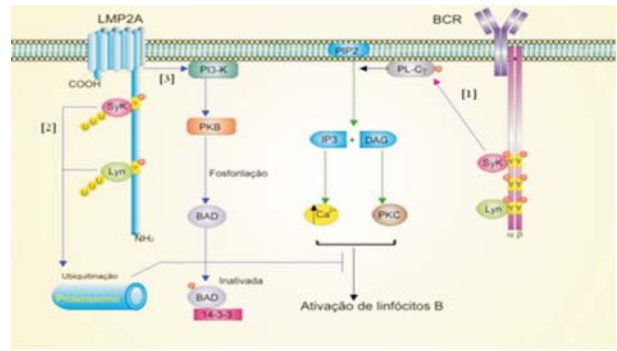


Notas: [1] ativação da via p38/MAPK, mediada pela ligação do TRAF2 diretamente na região CTAR1 (ativação fraca) ou indiretamente na CTAR2, por meio do TRADD (ativação forte); [2] ativação do NF-κB, mediante o recrutamento de NIK induzido pelos TRAFs (especialmente o TRAF2), promovendo a ativação da IKK que fosforila o inibidor IκB, liberando o NF-κB para atuar no núcleo; [3] ativação de STATs, mediada pela ativação da tirosina-quinase JAK3, que fosforila as moléculas STATs, induzindo dimerização e subsequente migração para o núcleo; [4] ativação da AP1 através da via JNK, induzida exclusivamente pelo TRAF2 na região CTAR2; regiões em amarelo, de ambas as proteínas membranares, apresentam a sequência PxQxT de aminoácidos; regiões em verde correspondem a sítios de ancoragem da JAK3. NIK, *NF-κB-inducing kinase*; IKK, *IκB kinase*; MAPK, *mitogen activated protein kinase*. (Adaptado de Young, Dawson e Eliopoulos¹³ e de Baumforth et al.²⁵).

Estudos com linhagens de células B demonstram que a LMP1 induz a expressão de: moléculas de adesão ICAM-1 (CD54), LFA1 (CD11a), LFA3 (CD58); receptor de transferrina (CD71); marcadores de ativação linfocítica CD21, CD23; receptor CD40; e indução de proteínas anti-apoptóticas, tais com BCL-2, Mcl-1 e A20^{7,13,22,25}. Rowe e colaboradores³⁹ verificaram que a regulação positiva de BCL-2 ocorria apenas em linhagens de células B. No entanto, a expressão de BCL-2 tem sido observada após a expressão das moléculas supracitadas, sugerindo que sua regulação seja dependente da expressão prévia desses mediadores¹². Já nas células epiteliares, estudos demonstraram que a LMP1 induz expressão de CD40, CD54, IL-6, IL-8, A20 e reduz a expressão de citoqueratinas e E-caderina, além de bloquear a diferenciação celular^{12,14,33,35}. A LMP1 induz também a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), por meio de uma via de sinalização induzida por TRAF's, independentemente da ativação do NF-κB.⁴⁰

Terrin e colaboradores⁴¹ demonstraram que expressão ectópica de LMP1, em linhagens de linfócitos B, promove a ativação do promotor *hTERT* e aumenta a atividade da telomerase pelo envolvimento dos fatores NF-κB, MAPK e ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*). O conjunto de efeitos induzidos pela LMP1, tais como a ativação de fatores transcripcionais (NF-κB,

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura da LMP2A e as vias de sinalização envolvidas.



Notas: [1] ativação da fosfolipase Cα (PL-Cα), mediada por tirosino-quinases Syk recrutadas pelos imunorreceptores ITAM, promove a clivagem do bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂), produzindo trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG), que desencadeiam vias bioquímicas distintas, resultando na elevação de cálcio citosólico e na ativação da proteína-quinase C (PKC), que favorecem a ativação de linfócitos B; [2] recrutamento de Lyn e Syk pela LMP2A e subsequente indução de ubiquitinação das mesmas, culminando na inibição da ativação de linfócitos B; [3] inativação da proteína Bad, através da ativação da PI-3K pela LMP2A que, por conseguinte, ativa a proteína-quinase B (PKB), levando à fosforilação da proteína Bad e a combinação com a proteína citosólica 14-3-3, que a mantém inativa; regiões em amarelo em ambas as proteínas membranares representam sequências ricas em tirosina. U, ubiquitina; Y, tirosina; ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*; PI-3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*. (Adaptado de Thorley-Lawson⁶).

AP-1, STATs e ATF2) e outras moléculas, possivelmente promove a transformação das células hospedeiras, conduzindo-as a um fenótipo tumoral.

LMP2

A LMP2 é codificada por sequências localizadas em ambas as extremidades do genoma viral, sendo transcrita a partir de dois promotores distintos, originando duas proteínas: LMP2A e LMP2B. Ambas exibem uma estrutura peptídica semelhante, apresentando domínio citoplasmático C-terminal, 12 domínios transmembranais e um discreto domínio extracelular, diferindo apenas no domínio citoplasmático N-terminal com 119 aminoácidos adicionais na LMP2A¹³. As duas proteínas se organizam na membrana plasmática das células hospedeiras, formando agregados.²⁵

Tem sido reportado que nenhuma das duas proteínas é essencial para a transformação de linfócitos B⁴². Contudo, a expressão de LMP2A em células B de memória circulantes EBV-positivas sugere que a LMP2A exerça importante papel na infecção persistente. Ambas atuam como receptor independente de ligante. Tem sido demonstrado que o domínio N-terminal da LMP2A apresenta oito resíduos de tirosina, dois dos quais (Y74 e Y85) formam um imuno-receptor semelhante aos

encontrados nas cadeias a e b dos receptores de célula B (BCR), chamados de ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*)⁶. A ativação de BCR leva à fosforilação dos resíduos de tirosina pela Lyn e o recrutamento de Syc tirosino-quinase (ambos, membros da família Src de tirosino-quinases), desencadeando uma cascata de sinalização que promove a diferenciação e proliferação de linfócitos B⁷. Contrariamente, a LMP2A sequestra e degrada Lyn e Syk, inibindo a sinalização do BCR e a subsequente ativação dessas células, e esse efeito inibe ainda a fosforilação pela fosfolipase C, bloqueando a mobilização normal de cálcio (FIGURA 3)¹. Esse conjunto de efeitos impede o desenvolvimento do ciclo lítico, promovendo a permanência do estado latente viral.¹⁴

Quanto à LMP2B, tem sido sugerido que atue aumentando o espaçamento entre as LMP2A nos aglomerados transmembranais, favorecendo a liberação das tirosino-quinases (Lyn e Syk) e restaurando a transdução de sinais de BCR⁴³. Adicionalmente, na ausência de antígenos, os BCR transmitem sinais não-proliferativos, que são essenciais para a sobrevivência das células B. Tem sido sugerido que a LMP2A mimetize esse tipo de sinalização, podendo prolongar a sobrevivência de células B infectadas⁶. Tem sido demonstrado que a LMP2A pode promover a transformação de células epiteliais, possivelmente em decorrência da ativação da via PI3-K/AKT. A ativação da AKT (também conhecida como proteína-quinase B - PKB) leva à fosforilação de várias proteínas, dentre elas a Bad (pró-apoptótica), contribuindo para a sobrevivência celular.⁷

EBER1 e EBER2

Esses dois transcritos virais são codificados por sequências presentes na região BamHI-N, separadas por 161pb¹³. O EBER1 e EBER2 possuem, respectivamente, 167 e 173 nucleotídeos de extensão e apresentam elevada similaridade entre suas estruturas secundárias. Apesar disso, o EBER2 exerce um papel importante na transformação de linfócitos B *in vitro*, enquanto o EBER1 parece ser dispensável⁴⁴. Esses dois RNAs virais são abundantemente expressos nos quatro tipos de latência descritos, atingindo 1.000.000 de transcritos por célula. Ambos apresentam uma taxa de transcrição equivalente, mas, devido ao rápido “turnover” do EBER2, os níveis de EBER1 são cerca de 10 vezes mais elevados. Curiosamente, os EBER não são poliadenilados, o que impede sua saída do núcleo da célula hospedeira, tornando-os um excelente alvo de detecção por hibridação *in situ*.⁴⁵

No núcleo, os EBER permanecem em complexos ribonucleoprotéicos. Foi demonstrado que a proteína ribossomal L22 (ou EAP, *EBER associated protein*) liga-se

ao EBER1, sugerindo que essa interação contribua para transformação celular, pelo fato de o gene da L22 estar envolvido nas translocações cromossômicas em pacientes com leucemia⁴⁶. Os EBER também se ligam à proteína-quinase ativada por RNA fita dupla (PKR), uma quinase que atua inativando o fator de iniciação de síntese protéica eIF-2, em função de estímulos antivirais de interferon (IFN) a e b. Tais efeitos variam desde inibição temporária da síntese protéica da célula hospedeira até apoptose.⁴⁷

A inserção dos genes EBER em linhagens de células Akata (de linfoma de Burkitt) EBV-negativas revelou que eles são responsáveis pela restituição da tumorigenicidade em camundongos SCID, crescimento em agar semi-sólido, resistência a estímulos apoptóticos e pelo aumento na expressão de BCL-2⁴⁸. Tem sido demonstrado que os EBER podem induzir a expressão de interleucina-10 (IL-10) em linhagens de linfoma de Burkitt, sugerindo que os referidos transcritos virais possam promover uma supressão do sistema imune do hospedeiro mediada por IL-10⁴⁴. Niller e colaboradores⁴⁹ demonstraram uma região de 130pb logo acima do gene viral EBER1, que contém uma sequência consenso para a ligação da proteína c-MYC. De fato, os EBER devem contribuir na tumorigênese e para o quadro de latência, considerando que são expressos nos quatro tipos de latência descritos e suprimidos durante a replicação viral.¹⁴

BARF1

É um gene localizado no fragmento BamHI-A, que codifica uma proteína denominada p29, descrito como gene latente exclusivamente em neoplasias de origem epitelial, tais como carcinoma de nasofaringe e gástrico, sendo descrito como um gene lítico precoce nas infecções de linfócitos-B⁵⁰. Todavia, Fiorini e Ooka⁵¹ detectaram a proteína secretada a partir de cultura de linhagens IB4 e Akata de linfócitos B (exibindo infecção latente). Foi demonstrado que a BARF1 é um homólogo do receptor do fator estimulador de colônia humano-1 (CSF-1), o qual está relacionado com a indução da proliferação de macrófagos e neutrófilos⁵². Contudo, tem sido relatado que o BARF1 neutraliza os efeitos proliferativos acima mencionados⁵³. Por outro lado, tem sido demonstrado que essa proteína imortaliza células epiteliais primárias humanas *in vitro* e induz um fenótipo tumoral em linhagens de fibroblastos⁵⁴, sendo, também, capaz de ativar a expressão de BCL-2 em fibroblastos de roedores, por meio de sua região N-terminal⁵⁵. Wang e colaboradores⁵⁶ demonstraram uma elevada expressão de BCL-2 em linhagens transgênicas de câncer gástrico expressando BARF1, o que reforça os achados prévios quanto à possibilidade de essa

proteína viral promover a sobrevivência celular. Recentemente, Jiang e colaboradores⁵⁷ demonstraram que o BARF1 coopera com o H-Ras e SV40 T na transformação de linhagens de células epiteliais humanas.

CONCLUSÕES

A importância dos genes latentes do EBV na oncogênese é denotada pelos efeitos observados em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, demonstrando que seus transcritos são capazes de interagir com vias de sinalização intracelular ou de agir diretamente no DNA hospedeiro, desencadeando efeitos que incluem estímulos à proliferação celular, bloqueio da apoptose, inibição da diferenciação celular, regulação do destino celular, expressão de receptores de superfície, produção de interleucinas e redução de moléculas de adesão intercelular. Nas neoplasias relacionadas, pelo menos quatro genes latentes virais são expressos e cada transcrito pode exercer mais de um efeito sobre a célula hospedeira, de modo que a soma desses efeitos é provavelmente responsável pela transformação celular que conduz a célula infectada a um fenótipo tumoral. Não obstante, os padrões de expressão dos genes latentes virais denunciam a complexa relação entre o EBV e as células hospedeiras, sugerindo haver diferentes mecanismos oncogênicos para cada tipo celular.

Em suma, a participação dos expressos latentes do EBV na gênese tumoral é evidente. No entanto, faz-se necessário o desenvolvimento de mais estudos visando a melhor compreender os mecanismos relacionados a cada neoplasia e, assim, identificar possíveis alvos terapêuticos, marcadores prognósticos e (ou) medidas profiláticas.

REFERÊNCIAS

- KIEFF, E. Epstein-Barr virus and its replication. In: FIELDS, B.N. et al. **Fundamental virology**. 3rd.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p.1109-1163.
- HSIEH, W.S.; AMBINDER, R.F.; LEMAS, M.V. The biology of Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disease. **Transpl. Infect. Dis.**, Copenhagen, v.1, p.204-212, 1999.
- ARRAND, J.R. et al. Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.9, n. 13, 1981.
- AMBINDER, R.F. et al. Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. **J. Virol.**, Washington, DC, v.65, n.3, p.1466-1478, Mar. 1991.
- TSUCHIYA, S. Diagnosis of Epstein-Barr virus-associated diseases. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, Limerick, v.44, p.227-238, 2002.
- THORLEY-LAWSON, D.A. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v.1, n.1, p.75-82, Oct. 2001.
- DOLCETTI, R.; MASUCCI, M.G. Epstein-Barr virus: induction and control of cell transformation. **J. Cell. Physiol.**, New York, v.196, p.207-218, 2003.
- AMBINDER, R.F.; MANN, R.B. Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.145, n.2, p.239-252, Aug. 1994.
- OHGA, S. et al. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, Limerick, v.44, p.203-215, 2002.
- LIMA, M.A.P.; RABERHORST, S.H.B. Associação do vírus de Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. **R. Bras. Cancerol., Rio de Janeiro**, v.52, n.1, p.87-96, 2006.
- AGÊNCIA INTERNACIONAL PARA A PESQUISA DO CÂNCER. **Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus 8**. Lyon, 1997. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v.70)
- KNECHT, H. et al. Epstein-Barr virus oncogenesis. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, Limerick, v.26, n.2, p.117-135, July 1997.
- YOUNG, L.S.; DAWSON, C.W.; ELIOPOULOS, A.G. The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. **Mol. Pathol.**, London, v.53, n.5, p.238-247, Oct. 2000.
- RAAB-TRAUB, N. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. **Semin. Cancer Biol.**, London, v.12, n.6, p.431-41, Dic. 2002.
- LEIGHT, E.R.; SUGDEN, B. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. **Rev. Med. Virol.**, Chichester, v.10, p.83-100, 2000.
- AMBINDER, R.F. et al. Definition of the sequence requirements for binding of the EBNA1 protein to its palindromic targets sites in Epstein-Barr virus DNA. **J.Virol.**, Washington, DC, v.64, p.2369-2379, 1990.
- SHAH, W.A. et al. Binding of EBNA-1 to DNA creates a protease-resistant domain that encompasses the DNA recognition and dimerization functions. **J. Virol.**, Washington, DC, v.66, p.3355-3362, 1992.
- LEVITSKAYA, J. et al. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. **Nature**, London, v.375, p.685-688, 1995.
- WILSON, J.B.; BELL, J.L.; LEVINE, A.J. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. **EMBO J.**, Oxford, v.215, p.40-50, 1996.
- DROTAR, M.E. et al. Epstein-Barr Virus nuclear antigen-1 and Myc cooperate in lymphomagenesis. **Int. J. Cancer**, New York, v.106, p.388-395, 2003.
- GRUHNE, B. et al. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v.106, n.7, p.2313-2318, Feb. 2009.
- MURRAY, P.G.; YOUNG, L.S. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. **Expert. Rev. Mol. Med.**, Cambridge, UK, v.15, p.1-20, Nov. 2001.
- RICKINSON, A.B.; YOUNG, L.S.; ROWE, M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA2 on the growth

- phenotype of virus-transformed B cells. **J. Virol.**, Washington, DC, v.61, p.1310-1317, 1987.
- 24 SINCLAIR, A.J. et al. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during the immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. **EMBO J.**, Oxford, v.13, p.3321-3328, 1994.
- 25 BAUMFORTH, K.R.N. et al. The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. **Mol. Pathol.**, London, v.52, p.307-322, 1999.
- 26 CLUDTS, I.; FARRELL, P.J. Multiple functions within the Epstein-Barr virus EBNA-3A protein. **J. Virol.**, Washington, DC, v.72, n.3, p.1862-1869, Mar. 1998.
- 27 ALLDAY, M.J.; FARRELL, P.J. Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C/6 expression maintains the level of latent membrane protein in G1-arrested cells. **J. Virol.**, Washington, DC, v.68, p.3491-3498, 1994.
- 28 CHU, P.G. et al. Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen (EBNA)-4 mutation in EBV: associated malignancies in three different populations. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.155, n.3, Sept. 1999.
- 29 PARKER, G.A. et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. **Oncogene**, Basingstoke, v.13, p.2541-2549, 1996.
- 30 BAJAJ, B.G. et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. **J. Virol.**, Washington, DC, v.82, n.8, p.4082-4090, Apr. 2008.
- 31 YI, F. et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C targets p53 and modulates its transcriptional and apoptotic activities. **Virology**, New York, v.388, n.2, p.236-247, June 2009.
- 32 SZEKELY, L. et al. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-coded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, DC, v.90, p.5455-5459, 1993.
- 33 YOUNG, L.S.; DAWSON, C.W.; ELIOPOULOS, A.G. Epstein-Barr virus and apoptosis: viral mimicry of cellular pathways. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v.27, p.807-812, 1999.
- 34 HIGA, M. et al. Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. **J. Clin. Pathol.**, London, v.55, p.414-423, 2002.
- 35 NIEDOBITEK, G. The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? **Virchows Arch.**, Berlin, v.435, p.79-86, 2000.
- 36 HERRERO, J.A.; MATHEW, P.; PAYA, C.V. LMP-1 activates NF- κ B by targeting the inhibitory molecule I κ B α . **J. Virol.**, Washington, DC, v.69, n.4, p.2168-2174, Apr. 1995.
- 37 ELIOPOULOS, A.G. et al. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates the JNK pathway through its extreme C terminus via a mechanism involving TRADD and TRAF2. **J. Virol.**, Washington, DC, v.73, n.2, p.1023-1035, Feb. 1999.
- 38 ELIOPOULOS, A.G. et al. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates Interleukin-6 and Interleukin-8 production. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.274, n.23, p.16085-16096, June 1999.
- 39 ROWE, M. et al. Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-Cell-specific response that is delayed relative to NF- κ B activation and to induction of cell surface markers. **J. Virol.**, Washington, DC, v.68, n.9, p.5602-5612, Sept. 1994.
- 40 MILLER, W.E. et al. Epstein-Barr virus LMP1 induction of the epidermal growth factor receptor is mediated through a TRAF signaling pathway distinct from NF- κ B activation. **J. Virol.**, Washington, DC, v.71, n.1, p.586-594, Jan. 1997.
- 41 TERRIN, L. et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus activates the hTERT promoter and enhances telomerase activity in B lymphocytes. **J. Virol.**, Washington, DC, v.82, n.20, p.10175-10187, Oct. 2008.
- 42 LONGNECKER, R. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? **Adv. Cancer Res.**, Amsterdam, v.79, p.175-200, 2000.
- 43 RECHSTEINER, M.P. et al. Latent membrane protein 2B regulates susceptibility to induction of lytic Epstein-Barr virus infection. **J. Virol.**, Washington, DC, v.82, n.4, p.1739-1747, Feb. 2008.
- 44 WU, Y. et al. Epstein-Barr virus (EBV)-Encoded RNA 2 (EBER2) but not EBER1 plays a critical role in EBV-induced B-cell growth transformation. **J. Virol.**, Washington, DC, v.81, n.20, p.11236-11245, Oct. 2007.
- 45 TAKADA, K.; NANBO, A. The role of EBERs in oncogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, London, v.11, p.461-467, 2001.
- 46 TOCZYSKI, D.P.; STEITZ, J.A. EAP, a highly conserved cellular protein associated with Epstein-Barr virus small RNAs (EBERs). **EMBO J.**, Oxford, v.10, p.459-466, 1991.
- 47 SHARP, T.V. et al. Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.21, p.4483-4490, 1993.
- 48 KOMANO, J. et al. Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. **J. Virol.**, Washington, DC, v.73, p.9827-9831, 1999.
- 49 NILLER, H.H. et al. The in vivo binding site for oncoprotein c-Myc in the promoter for Epstein-Barr virus (EBV) encoding RNA (EBER) 1 suggests a specific role for EBV in lymphomagenesis. **Med. Sci. Monit.**, Warsaw, v.9, n.1, p.1-9, Jan. 2003.
- 50 SETO, E. et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARF1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression. **J. Med. Virol.**, New York, v.76, n.1, p.82-88, May 2005.
- 51 FIORINI, S.; OOKA, T. Secretion of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 oncoprotein from latently infected B cells. **Virol. J.**, London, v.5, n.70, 2008.
- 52 STROCKBINE, L.D. et al. The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. **J. Virol.**, Washington, DC, v.72, p.4015-4021, 1998.
- 53 SHENG, W. et al. Malignant transformation of Epstein-Barr virus-negative Akata cells by introduction of the BARF1 gene carried by Epstein-Barr virus. **J. Virol.**, Washington, DC, v.77, n.6, p.3859-3865, 2003.
- 54 ZUR HAUSEN, A. et al. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric

- adenocarcinomas: expression of the transforming *BARF1* gene. **Cancer Res.**, Baltimore, v.60, p.2745–2748, May 2000.
- 55 SHENG, W. et al. N-Terminal domain of *BARF1* gene encoded by Epstein-Barr virus is essential for malignant transformation of rodent fibroblasts and activation of *BCL-2*. **Oncogene**, Basingstoke, v.20, n.10, p.1176-1185, Mar. 2001.
- 56 WANG, Q. et al. Anti-apoptotic role of *BARF1* in gastric cancer cells. **Cancer Lett.**, Limerick, v.20, p.1-14, 2005.
- 57 JIANG, R. et al. Synergism of *BARF1* with Ras induces malignant transformation in primary primate epithelial cells and human nasopharyngeal epithelial cells. **Neoplasia**, New York, v.11, n.9, p.964-973, Sept. 2009.