



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

DAVI EMANUEL RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO *IN SÍLICO* DE ANTÍGENO SINTÉTICO
MULTIEPÍTOPO A PARTIR DAS ONCOPROTEÍNAS E5, E6 E
E7 DOS HPVS DE ALTO RISCO 16, 18, 45, 31, 33, 58 E 52
PARA COMPOSIÇÃO DE VACINA TERAPÊUTICA CONTRA
O CÂNCER CERVICAL.**

Recife 2025

DAVI EMANUEL RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO *IN SÍLICO* DE ANTÍGENO SINTÉTICO
MULTIEPÍTOPO A PARTIR DAS ONCOPROTEÍNAS E5, E6 E
E7 DOS HPVS DE ALTO RISCO 16, 18, 45, 31, 33, 58 E 52
PARA COMPOSIÇÃO DE VACINA TERAPÊUTICA CONTRA
O CÂNCER CERVICAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas
Coorientadora: MSc. Maria da Conceição
Viana Invenção
Coorientadora: Dr^a Anna Jessica Duarte

Recife
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Ribeiro, Davi Emanuel.

Desenvolvimento in sílico de antígeno sintético multiepitópo a partir das oncoproteínas E5, E6 e E7 dos HPVs de alto risco 16, 18, 45, 31, 33, 58 e 52 para composição de vacina terapêutica contra o câncer cervical. / Davi Emanuel Ribeiro. - Recife, 2025.

86p. : il., tab.

Orientador(a): Antonio Carlos de Freitas

Coorientador(a): Maria da Conceição Invenção

Coorientador(a): Anna Jessica Duarte

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Imunoterapias. 2. Tratamentos terapêuticos. 3. Oncologia. 4. Vírus do Papiloma Humano. 5. Imunoinformática. 6. Antígeno Sintético. I. Freitas, Antonio Carlos de . (Orientação). II. Invenção, Maria da Conceição. (Coorientação). IV. Duarte, Anna Jessica. (Coorientação). V. Título.

570 CDD (22.ed.)

DAVI EMANUEL RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO *IN SÍLICO* DE ANTÍGENO SINTÉTICO
MULTIEPÍTOPO A PARTIR DAS ONCOPROTEÍNAS E5, E6 E E7 DOS
HPVS DE ALTO RISCO 16, 18, 45, 31, 33, 58 E 52 PARA
COMPOSIÇÃO DE VACINA TERAPÊUTICA CONTRA O CÂNCER
CERVICAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: 12/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr Antonio Carlos de Freitas
Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) – UFPE

Prof. Dr^a. Jamile taniele da silva
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino (NUPIT-SG)

Prof. Dr^a. Vanessa Emanuelle Pereira Santos
Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) - UFPE

Dedico este trabalho a toda minha família, amigos, orientadores, professores e todos que participaram da minha história, que me incentivaram a questionar o mundo, e acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas, e às minhas coorientadoras, Dra. Anna Jéssica Duarte e a MSc. Maria da Conceição Viana Invenção, que me apoiaram em todas as etapas do projeto. Destaco, em especial, a contribuição da Msc. Maria da Conceição, que esteve ao meu lado em cada fase, esclarecendo dúvidas e acreditando no meu potencial, o que foi fundamental para a concretização deste trabalho.

Agradeço à minha família, especialmente às minhas irmãs, à tia e à minha mãe, Deusa Ribeiro, que me incentivaram desde a infância a valorizar os estudos. Minha mãe, com seu amor incondicional e apoio inestimável, foi fonte de força em momentos de maior dificuldade e desespero.

Sou grato a todos que me acompanharam ao longo da minha jornada, desde o Ensino Médio até a Graduação. Aos amigos da universidade, amigos que compartilho a casa, que se tornaram uma verdadeira família, e à minha namorada, que esteve ao meu lado, proporcionando acolhimento em um ambiente longe de casa e transformando Recife em meu lar.

Agradeço ao Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) da UFPE, onde tive a oportunidade de conviver com pessoas incríveis que me ajudaram no percurso acadêmico e resgataram minha crença na ciência como instrumento de transformação.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Pernambuco, que me ofereceu estrutura, aprendizado e a bolsa de assistência estudantil. Agradeço também aos órgãos de fomento, como o CNPq e a PROPESQI, que contribuíram para minha permanência em Pernambuco durante o curso de bacharelado.

"É necessário sempre acreditar que o sonho é possível."
Racionais MC's, "A Vida é Desafio", 1993.

RIBEIRO, Davi Emanuel. **Desenvolvimento *in silico* de antígeno sintético multiepítipo a partir das oncoproteínas E5, E6 e E7 dos HPVs de alto risco 16, 18, 45, 31, 33, 58 e 52 para composição de vacina terapêutica contra o câncer cervical.** 2025. 86. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), especialmente pelos tipos de alto risco, é a principal causa de câncer cervical, destacando-se em países em desenvolvimento devido à ausência de programas de prevenção efetivo, em 2022, foram registrados cerca de 660.000 novos casos e 350.000 mortes, destacando a gravidade das infecções persistentes. Nesse contexto, vacinas terapêuticas baseadas em epítomos representam uma abordagem promissora para pacientes infectados, ao estimular uma resposta imune celular contra as oncoproteínas virais E5, E6 e E7, essenciais para a progressão tumoral e a evasão imunológica. Este estudo visou desenvolver um antígeno sintético multiepítipo a partir da predição de epítomos de células T para o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), direcionados aos genótipos HPV 16, 18, 45, 31, 33, 58 e 52. Foram realizadas predições de ligantes TCD8 + para MHC classe I, seguidas por análises de imunogenicidade, *clusterização*, conservação e cobertura populacional, utilizando ferramentas de imunoinformática para selecionar os epítomos mais promissores. Três epítomos de cada genótipo foram escolhidos, sendo um para cada oncoproteína E5, E6 e E7, totalizando 21 epítomos. A construção incluiu *linkers* AAY para modular a apresentação antigênica, o adjuvante TAT para aumentar a imunogenicidade e sítios de restrição que permitem a separação das proteínas. Os epítomos selecionados demonstraram alta especificidade citotóxica, com interações favoráveis nos testes de *docking* molecular com MHC-I, e ampla cobertura populacional, incluindo epítomos previamente validados na literatura. A modelagem estrutural indicou conformações estáveis, com resultados positivos nos testes de Ramachandran, e a análise secundária revelou características desejáveis, como peso molecular médio, estabilidade estrutural, ausência de toxicidade e propriedades antigênicas e não alergênicas. A clonagem *in silico* confirmou a viabilidade da construção com enzimas de restrição específicas. Esses resultados evidenciam a robustez da construção proposta, que apresentou eficiência em diversas metodologias aplicadas, destacando-se como uma abordagem relevante para estudos futuros. A construção proposta não apenas oferece potencial terapêutico contra cânceres associados ao HPV, mas também constitui uma base metodológica valiosa para o desenvolvimento de vacinas baseadas em peptídeos ou DNA. Além disso, o banco de dados gerado contribui para a ampliação do conhecimento científico e o avanço em estratégias de imunoterapia direcionadas.

Palavras-chave: Antígeno Multiepítomos. HPV. Proteínas E5, E6 e E7. Vacinas terapêuticas. Imunogenicidade.

RIBEIRO, Davi Emanuel. **Development of an *in silico* multi-epitope synthetic antigen from the E5, E6, and E7 oncoproteins of high-risk HPVs 16, 18, 45, 31, 33, 58, and 52 for the composition of a therapeutic vaccine against cervical cancer.** 2025. 86. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) infection, particularly by high-risk types, is the leading cause of cervical cancer, with a significant impact in developing countries due to the lack of effective prevention programs. In 2022, approximately 660,000 new cases and 350,000 deaths were reported, underscoring the severity of persistent infections. In this context, epitope-based therapeutic vaccines represent a promising approach for infected patients by stimulating a cellular immune response against the viral oncoproteins E5, E6, and E7, which are critical for tumor progression and immune evasion. This study aimed to develop a synthetic multiepitope antigen based on T-cell epitope prediction for the Major Histocompatibility Complex (MHC), targeting HPV genotypes 16, 18, 45, 31, 33, 58, and 52. CD8+ T-cell epitopes were predicted for MHC class I, followed by immunogenicity analyses, *clustering*, conservation, and population coverage assessments using immunoinformatics tools to select the most promising epitopes. Three epitopes from each genotype were chosen, one for each oncoprotein (E5, E6, and E7), totaling 21 epitopes. The design included AAY *linkers* to modulate antigen presentation, the TAT adjuvant to enhance immunogenicity, and restriction sites enabling the separation of the proteins. The selected epitopes demonstrated high cytotoxic specificity, favorable interactions in molecular *docking* assays with MHC-I, and broad population coverage, including epitopes previously validated in the literature. Structural modeling indicated stable conformations with positive results in Ramachandran tests, while secondary analysis revealed desirable features such as average molecular weight, structural stability, non-toxicity, and antigenic and non-allergenic properties. *in silico* cloning confirmed the construct's viability with specific restriction enzymes. These findings highlight the robustness of the proposed construct, which demonstrated efficiency across various applied methodologies, standing out as a relevant approach for future studies. The proposed construct not only offers therapeutic potential against HPV-associated cancers but also serves as a valuable methodological foundation for developing peptide- or DNA-based vaccines. Furthermore, the generated database contributes to the expansion of scientific knowledge and advancements in targeted immunotherapy strategies.

Key words: Multiepitope antigens. HPV. E5, E6 and E7 proteins. Therapeutic vaccines. Immunogenicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Taxas de incidência de câncer cervical (A) e mortalidade (B) em diferentes países em 2020.....	16
Figura 2 – Genoma do Papillomavirus Humano	18
Figura 3 – Patogênese da infecção por HPV	19
Quadro 1 – Principais funções das Proteínas <i>Early</i> do HPV	20
Figura 4 – Modelo da ubiquitação de p53 mediada por E6.....	22
Figura 5 – Atuação das oncoproteínas E6 e E7 na progressão do ciclo celular, inativação de pRB, e atuação de p53 em p21.....	24
Figura 6 – Fluxograma delimitando as diferentes etapas contidas nas construções dos antígenos sintéticos	33
Figura 7 - Representação do <i>docking</i> Molecular entre os epítomos selecionados e os HLAs representantes	47
Figura 8 - Modelo esquemático da construção Multiepítomos.....	50
Figura 9 - Modelagem do Multiepítomos e testes estruturais	52
Figura 10 – Mapa da Construção do Plasmídeo PVAX-1 Multiepítopo	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vacinas profiláticas desenvolvidas de 2006 até 2024 contra HPV	25
Tabela 2 – Resumo de características de estudos com vacinas terapêuticas para HPV em ensaios clínicos	28
Tabela 3 – Informações dos HLAs utilizados no <i>docking</i> molecular dos epítomos das construções vacinais.....	39
Tabela 4 – Resultados da quantidade de Epítomoss resultantes em cada etapa de triagem: predição, imunogenicidade, agrupamento de sequencias semelhantes e conservação	44
Tabela 5 – Lista dos Epítomos com maior cobertura populacional.	46
Tabela 6 – Testes de segurança e estabilidade da proteína multiepítopo	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	IMPACTO DO HPV NA SAÚDE PÚBLICA E AS DESIGUALDADES GLOBAIS.	15
2.2	ESTRUTURA, INFECÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HPV.....	17
2.3	PROTEÍNAS <i>EARLY</i> : PAPEL CENTRAL NO CICLO VIRAL E ONCOGÊNESE.	19
2.4	VACINAS CONTRA O HPV DA PROFILAXIA À TERAPIA	24
2.5	VACINAS TERAPÊUTICAS	26
2.6	BIOINFORMÁTICA E MULTIEPÍTOPO	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL	33
4.2	CRIAÇÃO DE BANCO DE DADOS.....	34
4.3	PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CELULAS T.....	34
4.4	ANÁLISES DOS EPÍTOPOS.....	35
4.5	AGRUPAMENTO DE SEQUENCIAS SEMELHANTES	35
4.6	ANALISE DE CONSERVAÇÃO DE EPÍTOPOSS.....	36
4.7	ANALISE DE COBERTURA POPULACIONAL	37
4.8	ANCORAGEM (<i>DOCKING</i>) MOLECULAR	37
4.9	CONSTRUÇÃO DO MULTIEPÍTOPO E MODELAGEM <i>IN SÍLICO</i>	40
4.9.1	Inserção de Enzimas de Restrição	40
4.9.2	Adição de <i>tag</i> de Histidinas	41
4.9.3	Inserção de <i>linkers</i> e adjuvantes	41
4.9.4	Modelagem da Estrutura	41
4.10	TESTES DE SEGURANÇA E ESTABILIDADE DO MULTIEPÍTOPO	42
4.11	CLONAGEM <i>IN SÍLICO</i>	43

5	RESULTADOS	43
5.1	PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS E IMUNOGENICIDADE.....	43
5.2	AGRUPAMENTO, COBERTURA E CONSERVAÇÃO DE SEQUÊNCIAS	45
5.3	ACOPLAMENTO MOLECULAR	47
5.4	CONSTRUÇÃO DA SEQUÊNCIA DE PROTEÍNAS E NUCLEOTÍDEOS.....	49
5.5	MODELAGEM DO MULTIEPÍTOPO	51
5.6	TESTES DE SEGURANÇA	53
5.7	CLONAGEM <i>IN SÍLICO</i>	56
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	61
	REFERENCIAS	62

APÊNDICES..... 72

APÊNDICE A – Lista de todos os Epítopos que obtiveram no mínimo 2 Epítopos com conservação mínima de 70% de identidade.....	72
APÊNDICE B – Cobertura Populacional em Epítopos pós conservação	73
APÊNDICE C – Epítopos finais selecionados e seus valores representativos obtidos	74
APÊNDICE D – Tabela com valor de afinidade de ligação com a fenda de HLA	75
APÊNDICE E – Epítopos na fenda do HLA e predições de suas ligações químicas.....	76
APÊNDICE F – Sequência da construção Multiepítopos e do vetor	85

1 INTRODUÇÃO

A infecção prolongada pelo Papilomavírus Humano (HPV) é a principal causa do câncer cervical, o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres. Em 2022, foram registrados cerca de 660.000 novos casos e 350.000 mortes, destacando a gravidade das infecções persistentes por genótipos de alto risco oncogênico do HPV (hrHPV) (Molina et al., 2024; WHO., 2024). As taxas de incidência e de mortes por câncer do colo do útero em países desenvolvidos estão reduzindo devido aos diversos programas de prevenção e rastreamento implementados. No entanto, em países em desenvolvimento ele continua sendo um dos mais prevalentes e a principal causa de mortes por neoplasias em mulheres (Arbyn et al., 2019). As vacinas contra HPV licenciadas são para fins profiláticos, não sendo eficazes para pacientes já infectados pelo HPV e com câncer cervical. As formas de tratamentos convencionais, como histerectomia, quimioterapia e radioterapia, além de serem métodos invasivos com efeitos adversos que dificultam o uso do tratamento completo, também são pouco eficazes em pacientes em estágio avançado (Monk et al., 2022).

Nesse contexto, torna-se fundamental investir em novas opções terapêuticas para pacientes com câncer cervical, como o desenvolvimento de terapias personalizadas que permitam ao próprio sistema imunológico da paciente combater as células cancerígenas. A imunoterapia destaca-se como uma abordagem promissora entre as alternativas de tratamento anticâncer em desenvolvimento, ao modular o sistema imunológico do hospedeiro para atingir células cancerosas de forma mais eficaz e específica. Dentre as diferentes estratégias imunoterapêuticas, as vacinas terapêuticas peptídicas apresentam-se como uma opção econômica em termos de produção e edição, quando comparadas aos tratamentos convencionais (Khiavi et al., 2017). Além disso, estudos apontam que abordagens terapêuticas baseadas em regimes de imunização com intervalos de tempo reduzidos (menos de um mês), em comparação com as terapias usuais, demonstraram efeitos antitumorais significativos em ensaios pré-clínicos. Esses resultados reforçam o potencial dessas estratégias no tratamento de cânceres associados ao HPV (Cordeiro et al., 2015; Liao et al., 2015; Melief et al., 2020).

Para otimizar o desenvolvimento dessas vacinas terapêuticas, é fundamental compreender o mecanismo de infecção do HPV e definir os antígenos mais

adequados. O HPV infecta células da membrana basal, explorando microfissuras em mucosas formadas pelo atrito durante a relação sexual. Durante o processo infeccioso, as proteínas precocemente produzidas (*Early*) — E1, E2, E4, E5, E6 e E7 — desempenham papel crucial na replicação viral e na evasão do sistema imunológico, enquanto as proteínas tardiamente sintetizadas (*Lately*), como L1 e L2, compõem o capsídeo viral (Roden & Stern, 2018).

As vacinas terapêuticas geram imunidade mediada por Linfócitos T Citotóxicos (CTL), ao atingir especificamente os antígenos iniciais (*Early*) do HPV. Este ataque é eficiente devido à persistência de proteínas virais nas células cancerosas, como E6 e E7, responsáveis pela transformação maligna. Contudo, estudos mostram que outros antígenos, como E1, E2, E4 e E5, também apresentam potencial como alvos terapêuticos. A proteína E5, em especial, destaca-se por seu papel na proliferação e imortalização celular, complementando E6 e E7 no desenvolvimento de vacinas contra o HPV (Ferrall et al., 2022, Venuti, 2011). Essa abordagem ressalta a possibilidade de explorar estratégias vacinais compostas por múltiplos epítomos, além disso, essas vacinas podem ser desenvolvidas mais rapidamente do que as vacinas tradicionais (Mo et al., 2022; Peng et al., 2021; Pandey et al., 2018).

Para viabilizar essa estratégia, as abordagens de imunoinformática possibilitam cada vez mais detalhes a respeito de informações e características de peptídeos, como afinidade de ligação, dados de eluição e aspectos associados aos complexos de imunohistocompatibilidade (MHCs) entre outras informações que favorecem otimização dos resultados, direcionando os esforços de pesquisa para os candidatos mais promissores aumentando sua eficácia ao focar nas regiões mais imunogênicas do patógeno (Hegde et al., 2018; Reynisson et al., 2021).

Diante disso, estudos voltados para a construção de genes sintéticos para vacinas terapêuticas, baseados na predição computacional de múltiplos epítomos, como E5, E6 e E7 das oncoproteínas, são fundamentais. Essas estratégias permitem o desenvolvimento de vacinas de amplo espectro, facilitando seu design, aumentando sua eficiência e promovendo avanços significativos tanto no tratamento de infecções já estabelecidas quanto na prevenção do desenvolvimento de malignidades.

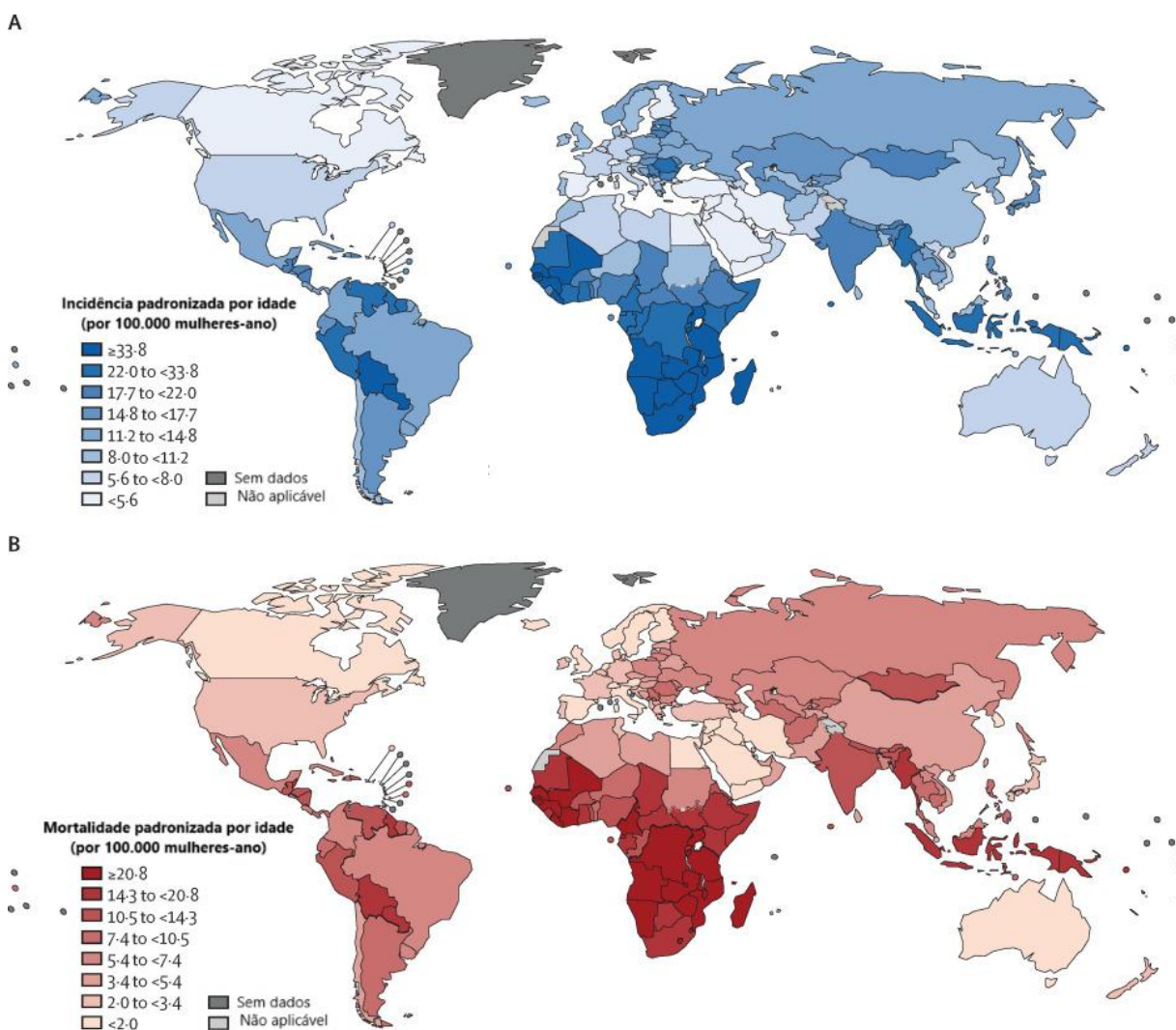
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPACTO DO HPV NA SAÚDE PÚBLICA E AS DESIGUALDADES GLOBAIS

O câncer cervical, reconhecido como a quarta principal causa de óbitos por câncer entre mulheres globalmente, configura-se como um dos principais desafios de saúde pública mundial. Em 2020, cerca de 604.000 mulheres foram diagnosticadas com câncer cervical, resultando em aproximadamente 342.000 mortes. Destas, 90% ocorreram em países de baixa e média renda, evidenciando uma disparidade marcante. A principal razão para essa discrepância está no acesso limitado a serviços de saúde pública, incluindo programas de triagem e tratamento adequados. A doença é quase exclusivamente causada por tipos oncogênicos do papilomavírus humano (HPV), transmitidos predominantemente por via sexual, reforçando a importância de estratégias eficazes de prevenção e controle. (Prudden et al., 2022). Os HPVs de alto risco, como os tipos 16 e 18, são responsáveis por uma parcela significativa dos casos de câncer cervical, anogenital e orofaríngeo, representando 73% e 90% desses casos, respectivamente.

A distribuição global da incidência revela profundas desigualdades regionais, a África Subsaariana apresenta as taxas mais elevadas de incidência ajustada por idade, com 19,3 casos por 100.000 pessoas-ano, enquanto em países de alta renda, a taxa é de apenas 6,9 casos por 100.000 pessoas-ano. Outras regiões, como Europa Central e Oriental, Sudeste Asiático, América do Sul e Índia, também enfrentam índices preocupantes. A proporção de câncer cervical atribuível ao HPV é significativamente maior em países de baixa renda (Figura 1), destacando a influência direta do acesso desigual a programas de prevenção, como vacinação e triagem regular (Dorji et al., 2021; Malagón et al., 2024).

Figura 1 - Taxas de incidência de câncer cervical (A) e mortalidade (B) em diferentes países em 2020.



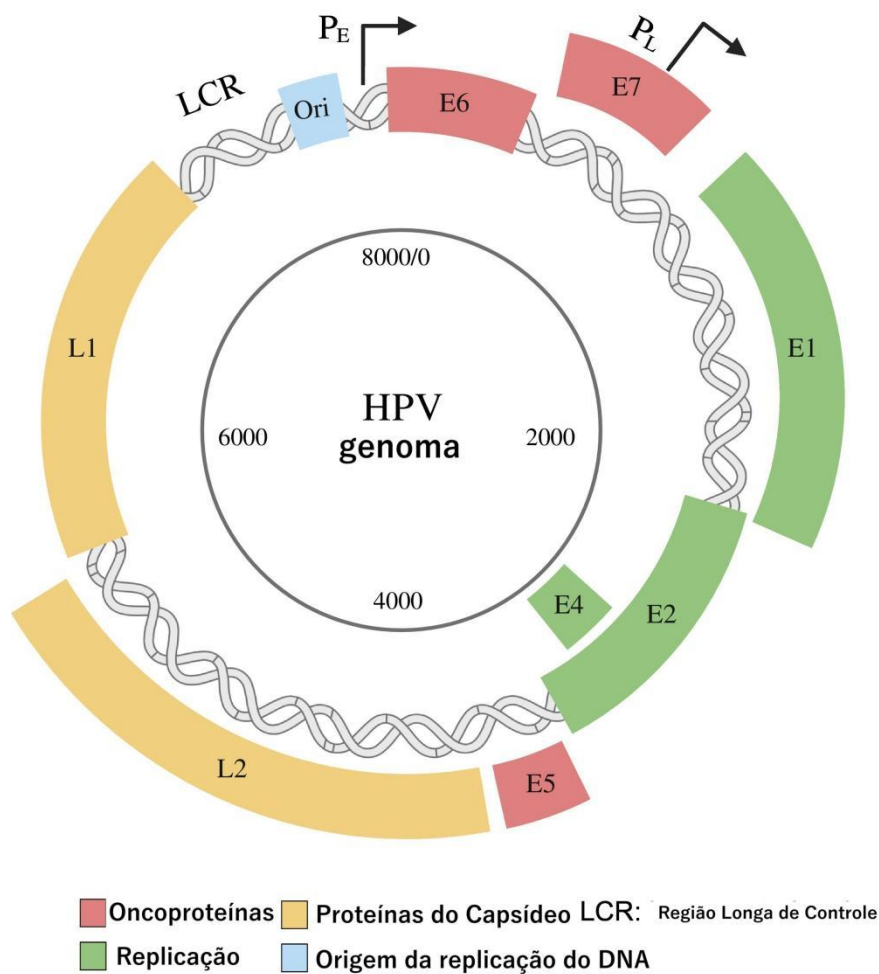
Fonte: IARC (2020) modificado pelo autor (2025)

Em países em desenvolvimento, a maioria das pacientes é diagnosticada em estágios avançados da doença, o que, somado ao acesso restrito a tratamentos adequados, resulta em altas taxas de mortalidade. Enquanto as diretrizes de tratamento em países de alta renda oferecem melhores resultados, essas estratégias muitas vezes não são viáveis em países de baixa e média renda devido à disponibilidade imprevisível de recursos. Estima-se que o tratamento de lesões cervicais de alto grau nesses países tenha um custo anual de US\$12,6 milhões, o que representa um desafio adicional para sistemas de saúde já sobrecarregados. Nesse contexto, terapias não cirúrgicas para lesões pré-invasivas causadas por HPV de alto risco (hrHPV) tornam-se alternativas altamente desejáveis. A imunoterapia se

destaca como uma abordagem promissora, pois os estágios pré-invasivos da infecção são bem definidos e a progressão para o câncer geralmente leva de 10 a 30 anos, oferecendo uma ampla janela para intervenções terapêuticas eficazes. (Small Jr. et al., 2017; Hancock et al., 2018) Entender o mecanismo de infecção e a organização do vírus HPV é fundamental para a criação de processos terapêuticos mais eficazes.

2.2 ESTRUTURA, INFECÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HPV

A transmissão do HPV ocorre predominantemente por contato sexual, afetando cerca de 80% das mulheres ao longo da vida. Em aproximadamente 90% dos casos, a infecção é eliminada pela resposta imunológica inata em até 12 meses. Contudo, infecções persistentes por genótipos de alto risco, como HPV16 e HPV18, estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias cervicais, sendo responsáveis por cerca de 70% dos casos globais de câncer cervical. Esses tipos tendem a se integrar ao genoma do hospedeiro, aumentando sua agressividade. Por outro lado, genótipos de baixo risco, como HPV 6 e HPV 11, estão associados a condições benignas, como verrugas e não costumam integrar o material genético ao genoma do hospedeiro (Szymonowicz, 2020). O HPV é um vírus de DNA de fita dupla e não envelopado, com mais de 100 genótipos conhecidos. Seu genoma é dividido em três regiões funcionais: a região regulatória montante (URR), essencial para a regulação da transcrição e replicação do DNA viral; a região precoce (E), que codifica proteínas cruciais para a replicação viral, como E1, E2, E4, E5, E6 e E7; e a região tardia (L), responsável pelas proteínas estruturais L1 e L2 (Figura 2). Essas regiões codificam proteínas por meio de Open Reading Frames (ORFs), que desempenham papel ativo na replicação viral. Apesar da variabilidade na URR entre os genótipos, as regiões E e L são mais conservadas, sendo comuns a diversos tipos de HPV. (Gardini, 2022; Bhatla; Singhal, 2020).

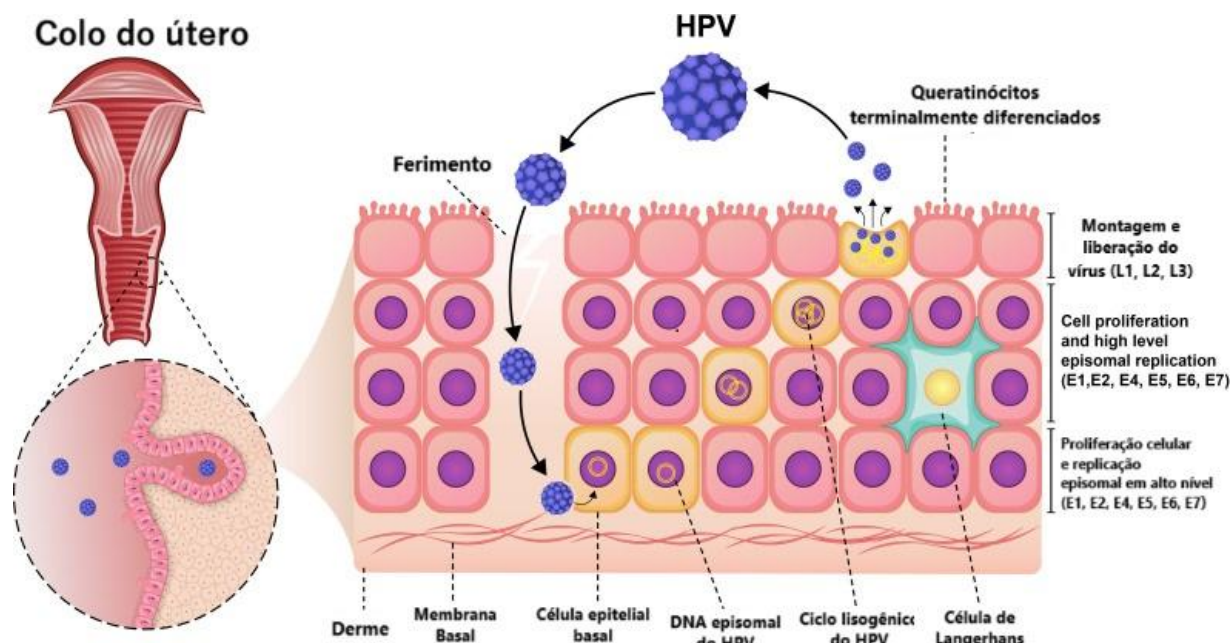
Figura 2 – Genoma do Papillomavirus Humano

Fonte: Molina et al. (2024) modificado pelo autor (2025)

Durante o ciclo de vida da infecção pelo HPV, o vírus atinge a membrana basal do epitélio através de microlesões, infectando os queratinócitos, células epiteliais responsáveis pela produção de queratina e que compõem a barreira protetora da pele e mucosas. Inicialmente, o HPV permanece em sua forma epissomal, ou seja, como um elemento extracromossômico, nas células epiteliais basais. Contudo, sua replicação ocorre nas camadas epiteliais superiores, onde as células estão mais diferenciadas, o vírus utiliza o processo natural de renovação do epitélio estratificado para completar seu ciclo de vida (Figura 3).

Após a replicação e expressão de suas oncoproteínas, o HPV pode persistir no tecido infectado e, em alguns casos, integrar-se ao genoma da célula hospedeira, um evento crítico para a progressão para malignidade. (Molina et al., 2024).

Figura 3 - Patogênese da infecção por HPV. O vírus inicialmente permanece latente na célula epitelial com baixa proliferação. Ao entrar no ciclo lisogênico, a proliferação celular aumenta, e, por fim, os vírus são montados e secretados pelos queratinócitos para reiniciar o ciclo de infecção.



Fonte: Yousefi et al. (2022) modificado pelo autor (2025)

Os tipos de HPV de alto risco têm a capacidade de estimular o crescimento das células tanto nas camadas mais profundas quanto nas mais superficiais do tecido. Isso faz com que uma infecção normal se transforme em uma infecção que não consegue completar todo o ciclo de vida do vírus, mas que ainda ativa processos importantes que levam à transformação das células infectadas. Entre os tipos de alto risco, o HPV16 se destaca por ser mais oncogênico. Essa característica está relacionada à ação das proteínas E6 e E7. Nos tipos de baixo risco, essas proteínas também estão presentes, mas sua função é apenas ajudar o vírus a se multiplicar e se espalhar. Por isso, nos casos de infecção por tipos de baixo risco, dificilmente surgem lesões que possam evoluir para o câncer, e integrar o DNA (de Sanjosé et al., 2018).

2.3 PROTEÍNAS *EARLY*: PAPEL CENTRAL NO CICLO VIRAL E ONCOGÊNESE

As proteínas *Early* (E) do HPV são produzidas nas primeiras fases da infecção e desempenham papéis chave na replicação viral e na modulação do ciclo celular da célula hospedeira. Existem 8 proteínas E: E1 a E7 (Quadro 1), com destaque para

E6 e E7, que estão associadas ao desenvolvimento de cânceres, como o câncer cervical. Para começar a discussão, pode-se abordar E1 e E2, que estão envolvidas na replicação do DNA viral (Balasubramaniam et al, 2019).

Quadro 1 – Principais funções das Proteínas *Early* do HPV

Proteína Viral	Funções das proteínas
E1	Replicação e transcrição do DNA viral
E2	Replicação do DNA viral, apoptose, repressor da transcrição de E6/E7
E4	Replicação do DNA viral
E5	Reconhecimento imunológico (complexo principal de histocompatibilidade, MHC)
E6	degradação de p53, alteração da regulação do ciclo celular, resistência à apoptose
E7	degradação do retinoblastoma (pRb), reentrada no ciclo celular da fase S, superexpressão de p16
L1	Proteína principal do capsídeo viral
L2	Proteína menor do capsídeo viral

Fonte: Balasubramaniam et al. (2019) modificado pelo autor (2025)

A proteína E1, uma helicase de DNA dependente de ATP, é responsável por iniciar e catalisar a replicação do DNA viral, regulando a manutenção do epissomo nas células epiteliais basais. Além disso, a E1 ativa vias de resposta ao dano no DNA, essenciais para a integração viral, e facilita a replicação simultânea dos genomas viral e hospedeiro (Molina et al., 2024). A proteína E2 atua em conjunto com E1, recrutando-a para a origem da replicação e regulando negativamente o promotor viral p97, que controla a transcrição das oncoproteínas E6 e E7. A interrupção da função reguladora de E2, durante a integração viral, resulta na expressão descontrolada de E6 e E7 (Graham, 2017; Oyervides-Muñoz et al., 2018). Por sua vez, a proteína E4 está associada à fase tardia da replicação viral e desempenha um papel na reorganização do citoesqueleto celular, facilitando a liberação dos vírions formados. Embora pouco explorada em termos terapêuticos, a regulação de sua fosforilação pode ser uma estratégia para limitar a transmissão viral (Bhattacharjee et al., 2022).

Em seguida abordaremos as proteínas E5, E6 e E7 do HPV, são conhecidas pelas suas funções de oncogenes no desenvolvimento de cânceres. A E5 é uma

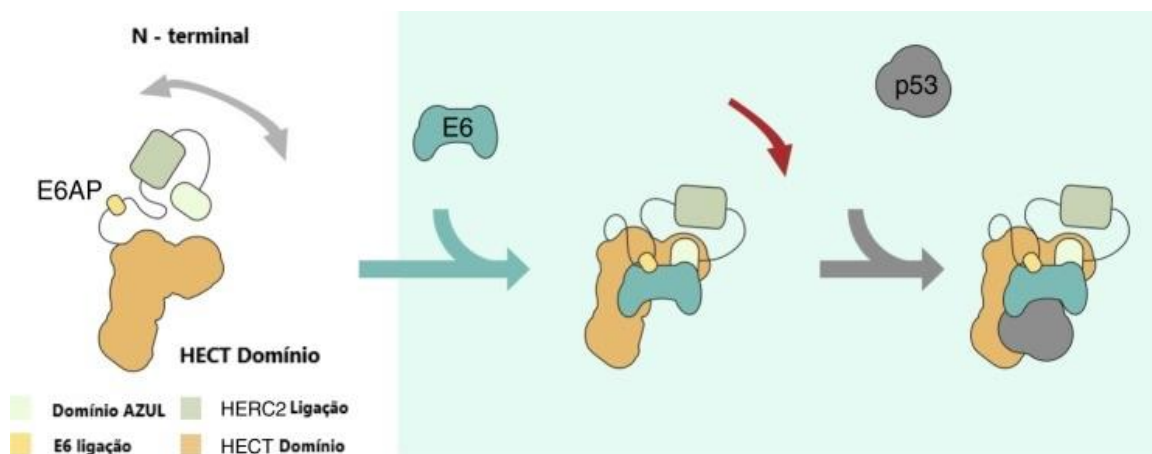
oncoproteína que desempenha um papel fundamental tanto nas fases iniciais quanto nas finais do ciclo celular. Nos estágios iniciais da infecção, a E5 promove a imortalização celular, com a transativação dos genes virais, o que aumenta a expressão das oncoproteínas E6 e E7, sugerindo sua relevância no desenvolvimento do câncer cervical. (Gardini, 2022; Balasubramaniam et al., 2019; Bhat, 2022). Além disso, ela desempenha um papel importante na angiogênese, processo essencial para o crescimento tumoral, ativando as vias ERK e PI3K-AKT, e aumentando a produção de VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) (Bhattacharjee et al., 2022). A E5 também se liga à BAP31 (proteína associada ao receptor de células B), modulando o transporte de proteínas nas membranas celulares e influenciando as funções do EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), o que, quando ativado, estimula o crescimento celular (Bhattacharjee et al., 2022). Além disso, a E5 reduz os níveis de MHC 1, o que dificulta a identificação de células infectadas pelo sistema imunológico, contribuindo para a evasão imunológica (Supryniewicz et al., 2008). A E5 também inibe a apoptose, bloqueando ligantes como FasL (ligante do receptor Fas) e TRAIL (ligante relacionado ao fator de necrose tumoral), além de regular o DISC (complexo de sinalização indutor de morte), favorecendo a sobrevivência e imortalidade das células infectadas (Kabsch e Alonso, 2002). Nos tipos HPV-16 e HPV-18, a E5 estimula a proliferação celular, altera genes relacionados à adesão e motilidade celular e suprime a apoptose, o que torna essa proteína um alvo terapêutico importante no tratamento do câncer cervical induzido pelo HPV (Balasubramaniam et al., 2019; Bhattacharjee et al., 2022).

A proteína E6 é uma oncoproteína essencial para a progressão oncogênica induzida pelo HPV. Ela desempenha um papel significativo ao inibir a apoptose e a diferenciação celular, além de alterar o formato, a polaridade, a mobilidade e os mecanismos de sinalização da célula. (Młynarczyk-Bonikowska e Rudnicka, 2024). A proteína E6 do HPV promove a degradação da p53, um importante supressor de tumor, por meio de um processo conhecido como ubiquitilação. Esse processo envolve a adição de moléculas de ubiquitina a uma proteína-alvo, sinalizando-a para ser destruída pelo proteassoma, que funciona como o sistema de reciclagem da célula. A E6 interage com a E6AP (E6-associated protein), uma enzima pertencente à família das ligases de ubiquitina (enzimas E3), cuja função é transferir ubiquitinas para proteínas-alvo específicas. Normalmente, a E6AP não consegue atingir a p53

por conta própria, mas a E6 atua como um adaptador, conectando a p53 à E6AP ao se ligar simultaneamente a ambas as proteínas. (Sailer et al., 2018).

Essa interação entre E6 e E6AP induz uma mudança conformacional no E6AP, posicionando seu domínio funcional HECT (região responsável pela transferência de ubiquitina) próximo à p53. Essa proximidade facilita a transferência direta das moléculas de ubiquitina do E6AP para a p53 de maneira altamente eficiente, uma vez que a E6 orienta as duas proteínas dentro do mesmo complexo (Figura 4). Após ser ubiquitilada, a p53 é direcionada ao proteassoma para degradação. Como a p53 é essencial para regular a apoptose (morte celular programada) e impedir a divisão celular descontrolada, sua degradação favorece a sobrevivência e proliferação das células infectadas pelo HPV, contribuindo significativamente para o desenvolvimento do câncer cervical. (Sailer et al., 2018; Młynarczyk-Bonikowska e Rudnicka, 2024).

Figura 4 – Modelo da ubiquitação de p53 mediada por E6. O modelo ilustra como a interação entre E6, E6AP e p53 no complexo enzima-substrato promove uma reorganização conformacional no E6AP, aproximando o domínio AZUL do domínio HECT. Isso posiciona E6 e o substrato p53 próximos ao centro catalítico de E6AP, onde E6 atua como um adaptador facilitando a transferência direta de ubiquitina do domínio HECT de E6AP para p53.



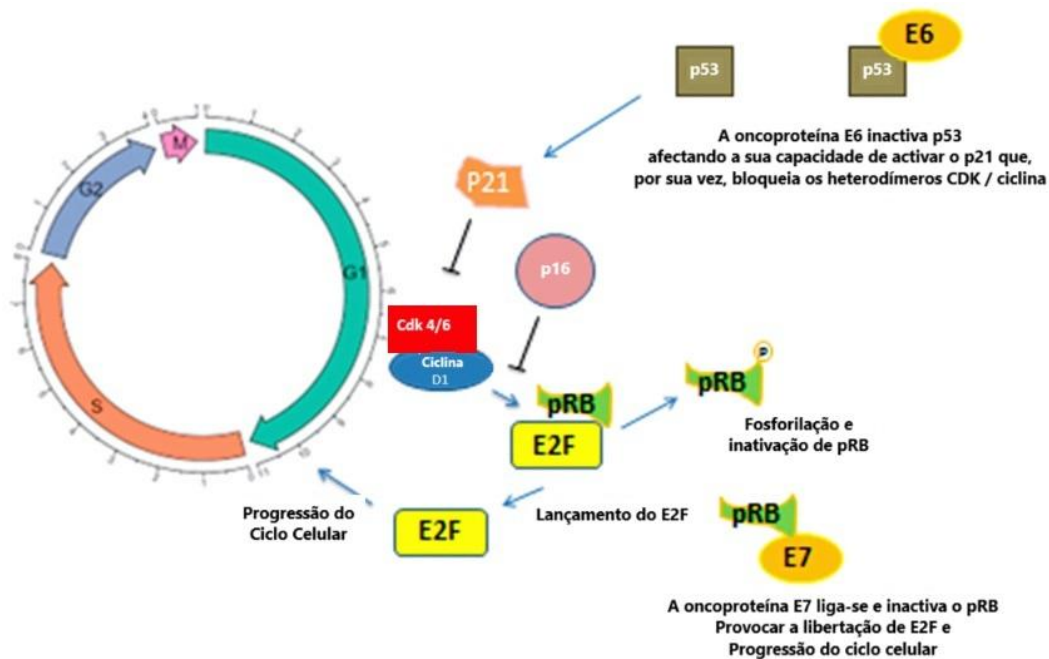
Fonte: Sailer et al. (2018) modificado pelo autor (2025)

A oncoproteína E7, presente no HPV, é um dos principais mediadores da progressão do ciclo celular em células infectadas pelo vírus. Sua principal função é a inativação da proteína retinoblastoma (pRB), um regulador essencial do ciclo celular

e um supressor tumoral (Basukala; Banks, 2021). Na sua forma normal, a pRB se encontra associada ao fator de transcrição E2F, impedindo sua ativação. O complexo pRB/E2F é um importante ponto de controle na transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, já que E2F é responsável pela ativação de genes necessários para a progressão do ciclo. Quando o pRB está ligado ao E2F, a célula não consegue avançar para a fase S, o que permite a detecção de danos e previne a replicação descontrolada (Moody; Laimins, 2010). A oncoproteína E7 se liga diretamente à pRB, induzindo sua fosforilação e inativação. Com a pRB inativada, o E2F é liberado e se torna ativo (Figura 5). Isso permite a expressão de genes necessários para a progressão da célula para a fase S, incluindo aqueles envolvidos na replicação do DNA. Essa ação de E7 acelera a transição do ciclo celular, permitindo que a célula continue se dividindo sem as devidas verificações e controles, favorecendo a proliferação celular descontrolada (Perri et al., 2020).

Além disso, E7 desregula ainda mais o controle do ciclo celular ao se ligar a inibidores de cinase dependente de ciclina, como p21 e p27, que normalmente controlam a atividade de quinases envolvidas na transição do ciclo (Figura 5). E7 também estimula a produção de ciclinas e ativa diretamente a quinase dependente de ciclina 2 (CDK2), promovendo a transição para a fase S e facilitando a divisão celular sem o controle necessário (Moody; Laimins, 2010). Quando E7 é coexpresso com a oncoproteína E6, também do HPV, a célula perde a capacidade de induzir a apoptose dependente de p53. E6 promove a degradação de p53, impedindo que ela exerça sua função normal de ativação da P21, um inibidor da quinase dependente de ciclina (Cdk)(Figura 5). Isso permite que a célula continue se dividindo mesmo na presença de danos no DNA, contribuindo para a instabilidade cromossômica (Moody; Laimins, 2010; Perril et al., 2020). Em resumo, a E7 é essencial para a transformação celular e progressão do câncer, atuando de diversas maneiras, como a desregulação do ciclo celular, degradação de proteínas supressoras de tumor e interferência na resposta imune (Basukala; Banks, 2021).

Figura 5 - Atuação das oncoproteínas E6 e E7 na progressão do ciclo celular, inativação de pRB, e atuação de p53 em p21. As oncoproteínas E6 e E7 do HPV promovem a progressão do ciclo celular, especialmente na transição G1/S. E6 inativa p53, impedindo sua ativação de p21, enquanto E7 age diretamente na proteína pRB, liberando E2F e estimulando a progressão celular, resultando em proliferação descontrolada.



Fonte: Perril et al (2020) modificado pelo autor (2025)

Desse modo, a interação entre E6 e E7 facilita a transformação celular, enquanto E5 potencializa esse processo. Essas proteínas representam alvos essenciais para intervenções terapêuticas contra o câncer cervical e o HPV. Tais estratégias destacam o grande potencial translacional dessas proteínas, oferecendo novas perspectivas para o tratamento e prevenção do câncer cervical (Moody; Laimins, 2010; Bhattacharjee et al., 2022).

2.4 VACINAS CONTRA O HPV DA PROFILAXIA À TERAPIA

A compreensão do processo carcinogênico e das proteínas do HPV possibilitou o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra o HPV. Entre essas vacinas atualmente liberadas, todas são baseadas em proteínas L1 recombinantes que se organizam em partículas semelhantes a vírus (VLPs), induzindo uma

respostaimunológica eficaz (Illah e Olaitan, 2023). Desde a aprovação da primeira vacina, Gardasil®, em 2006, várias formulações foram desenvolvidas (tabela 1).

Tabela 1: Vacinas profiláticas desenvolvidas de 2006 até 2024

Vacina	Formulação	Tipos de HPV Protegidos
Gardasil®	Quadrivalente	6, 11, 16, 18
Cervarix®	Bivalente	16, 18
Gardasil9®	Nonavalente	6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58
Cecolin®	Bivalente	16, 18
Walvax®	Bivalente	16, 18
Cervavac®	Quadrivalente	6, 11, 16, 18

Fonte: Mlynarczyk-Bonikowska; Rudnicka, 2024 modificado pelo autor (2025)

Além dessas vacinas baseadas na proteína L1, pesquisas estão avançando no desenvolvimento de vacinas baseadas na proteína L2. Por ser altamente conservada, a L2 oferece potencial para proteção de amplo espectro contra diferentes tipos de HPV. No entanto, a menor imunogenicidade da L2 exige estratégias como a conjugação a transportadores ou a agentes imunoestimulantes (Yousefi et al., 2022).

As vacinas profiláticas contra o HPV, como a bivalente e quadrivalente, demonstraram certa eficácia na redução da recorrência de lesões cervicais, quando associada a remoção cirúrgica, especialmente em lesões do tipo CIN (neoplasia intraepitelial cervical), uma condição precursora do câncer cervical (Mlynarczyk-Bonikowska; Rudnicka, 2024). Estudos indicam que mulheres vacinadas apresentam uma taxa menor de recorrência das lesões após cirurgia em comparação às não vacinadas, com eficácia variando entre 42,6% e 88,2%, dependendo do grau da lesão (CIN 1-3) (Mlynarczyk-Bonikowska; Rudnicka, 2024).

No entanto, a eficácia das vacinas é limitada no tratamento de infecções já estabelecidas. Isso ocorre porque as vacinas são projetadas para prevenir infecções iniciais ao estimular a produção de anticorpos contra a proteína L1 do HPV, bloqueando a entrada do vírus nas células. Contudo, uma vez que o HPV já tenha infectado as células e integrado seu material genético ao DNA celular, a vacina não tem efeito sobre o vírus latente ou integrado (Hancock et al., 2018). A eficácia das vacinas em reduzir a recorrência de lesões de CIN foi observada após a remoção

cirúrgica das lesões, com uma meta-análise indicando apenas uma redução provável na recorrência de CIN 2-3, especialmente para as lesões causadas pelos tipos de HPV 16 e 18. Para outros tipos de lesões causadas por HPV, as evidências ainda são insuficientes (Kechagias et al., 2022).

Sendo assim, apesar da eficácia, as vacinas profiláticas contra o HPV induzem apenas uma resposta humoral, prevenindo infecções iniciais, mas sem efeito terapêutico em infecções já estabelecidas. Essa limitação incentivou o desenvolvimento de vacinas terapêuticas, focadas em estimular a imunidade celular para tratar infecções e lesões causadas pelo HPV (Illah & Olaitan, 2023).

2.5 VACINAS TERAPÊUTICAS

As vacinas terapêuticas têm como objetivo estimular respostas imunológicas celulares específicas contra antígenos-alvo, promovendo a eliminação de células infectadas. Indicadas para casos de doença estabelecida, buscam a regressão de lesões pré-cancerosas e remissão de câncer invasivo. Embora diversos candidatos estejam em estudos avançados, ainda faltam evidências de eficácia na fase 3 para viabilizar seu licenciamento (Gonçalves et al., 2024). As diversas vacinas terapêuticas em estudo podem ser observadas na tabela 2.

As diferentes estratégias de vacinação apresentam características distintas, cada uma com *vantagens* e limitações que influenciam a escolha da vacina para determinadas condições. Entre as vacinas de vetores vivos, destacam-se as bacterianas e virais. As vacinas baseadas em vetores bacterianos são vantajosas por sua produção econômica e em larga escala, além de induzirem uma resposta imune robusta, tanto inata quanto adaptativa. No entanto, a imunodominância do vetor pode comprometer a repetição da terapia, pois os anticorpos gerados contra o vetor podem neutralizá-lo, reduzindo sua eficácia em aplicações subsequentes. Já as vacinas de vetor viral têm a *vantagem* de serem eficientes na infecção das células hospedeiras e na expressão do antígeno, estimulando tanto a resposta imune inata quanto adaptativa. Contudo, essa estratégia também enfrenta problemas de toxicidade e imunodominância, o que limita o número de aplicações repetidas (Wang et al., 2020; Schoen et al., 2008).

As vacinas de RNA são facilmente produzidas e entregam eficientemente o antígeno nas células. Contudo, sua instabilidade térmica e a baixa imunogenicidade podem resultar em uma resposta imune fraca. Como essa abordagem ainda é relativamente nova, mais estudos são necessários para confirmar sua eficácia em larga escala e superar suas limitações (Lundstrom, 2018).

As vacinas proteicas ou peptídicas são rápidas, estáveis e de fácil produção, sem restrições relacionadas ao HLA, o que amplia sua aplicabilidade em diferentes grupos de pacientes. No entanto, sua principal limitação é a baixa imunogenicidade, com a resposta imune sendo predominantemente humoral e menos eficaz em alguns casos. As vacinas peptídicas, que também são rápidas e fáceis de armazenar, podem ser editadas para melhorar a interação com o MHC, potencializando a resposta imune. Contudo, a restrição de HLAs pode reduzir sua eficácia em uma população diversificada, uma vez que nem todos os indivíduos possuem os mesmos tipos de HLA (Hung et al., 2008; Afrough et al., 2019).

As vacinas baseadas em células dendríticas (DCs) se destacam pela capacidade de induzir respostas imunológicas eficazes tanto inatas quanto adaptativas, com alta imunogenicidade. No entanto, enfrentam desafios relacionados à produção em larga escala e à consistência da qualidade das células. As DCs podem ser carregadas com antígenos específicos ou modificadas geneticamente para melhorar a resposta imunológica, mas problemas como a apoptose precoce limitam sua eficácia. A terapia com células T adotivas (ACT), que envolve a expansão e reinfusão de células T específicas para antígenos, tem mostrado ser uma abordagem promissora para o tratamento de cânceres relacionados ao HPV, com alguns estudos evidenciando respostas objetivas em pacientes. No entanto, a eficácia da ACT ainda é afetada por questões como evasão imunológica e a complexidade dos tumores sólidos (Steinman, 2012; Rahma et al., 2014).

No contexto das vacinas de DNA, essas apresentam a *vantagem* significativa de não apresentarem risco de integração cromossômica, podendo ser produzidas, purificadas e armazenadas de forma relativamente simples. A utilização do próprio aparelho celular para processar o antígeno e apresentá-lo ao MHC permite a repetição da terapia, o que é uma característica desejável em contextos terapêuticos. Entretanto, a instabilidade do DNA em algumas condições pode comprometer a

resposta imune a longo prazo, além de exigir células vivas para amplificação e entrega, tornando o processo mais complexo (Kim et al., 2014, p. 5317; Vici et al., 2016).

A evolução das vacinas de DNA tem levado à formulação de vacinas de Multiepítomos, que incorporam sequências de múltiplos epítomos de antígenos para melhorar a imunogenicidade e a eficácia terapêutica. Essas vacinas oferecem um panorama promissor para o tratamento de doenças como o câncer cervical, associadas a infecções persistentes por HPV, pois podem induzir uma resposta imune mais ampla e eficaz, direcionando múltiplos pontos do patógeno.

Com o desenvolvimento de vacinas de Multiepítomos de DNA, surge uma abordagem inovadora que busca superar limitações associadas à apresentação de antígenos por meio de múltiplos epítomos que são intercalados com *linkers*, promovendo uma resposta imune mais robusta e específica. Essa estratégia está sendo cada vez mais explorada como uma alternativa promissora para aumentar a eficácia das vacinas terapêuticas contra o câncer e infecções virais. A contínua pesquisa nesse campo permitirá o aprimoramento dessas vacinas, proporcionando novas perspectivas no tratamento de doenças relacionadas ao HPV (Nemati et al., 2022; Zhu et al., 2024).

Tabela 2 – Resumo de características de estudos com vacinas terapêuticas para HPV em ensaios clínicos.

Vacina	Estratégia vacinal	Antígeno	Resultado	Referência
ZYC101	DNA	HPV 16 E7	Resposta histológica completa observada em 33% dos casos, resposta imunológica significativa em 73%, sem registro de eventos adversos graves.	Sheets et al., 2003
ZYC101a	DNA	HPV 16 e 18 E6 e E7	Alta taxa de resolução do CIN 2/3, aumento significativo de resposta imune em pacientes < 25 anos.	Garcia et al., 2004
MVA E2	Vetor viral recombinante	HPV 16 E2	Redução significativa da carga viral em 35% dos pacientes, desenvolvimento de resposta imune específica.	Garcia-Hernández et al., 2006
HPV 16 L1E7 CVLP	Vetor viral recombinante	HPV 16 L1 e E7	Regresso histológico em 39% dos pacientes, aumento significativo de anticorpos específicos contra HPV 16.	Kaufmann et al., 2007

Vacina	Estratégia vacinal	Antígeno	Resultado	Referência
SGN-00101	Vetor bacteriano recombinante	HPV 16 E7	Resposta imunológica em 52% dos pacientes, regressão completa em 35% dos casos.	Roman et al., 2007
pNGVI4A-Sig/E7(detox)	DNA	HPV 16 E7	Regressão histológica de 33%, sem aumento significativo de anticorpos.	Trimble et al., 2009
TG4001	Vetor viral recombinante	HPV 16 E6 e E7	Resposta clínica de 80%, regressão das lesões de HPV 16 associadas à infecção.	Brun et al., 2011
CIGB-228	Peptídeo	HPV 16 E7	Eliminação de HPV em 57% dos pacientes, resposta celular observada em todos os pacientes.	Solares et al., 2011
Peptide vaccine	Peptídeo	HPV 16 E6 e E7	Aumento significativo de células T específicas para HPV 16, mas sem mudança no status viral.	Van Steenwijk et al., 2012
GLBL101c	Vetor bacteriano recombinante	HPV 16 E7	Regressão histológica para CIN2 de 80%, indução de imunidade mucosa específica para E7.	Kawana et al., 2014
pGX-188E	DNA	HPV 16 e 18 E6 e E7	Resposta virológica de 78% de taxa, aumento significativo de células T específicas.	Kim et al., 2014
Pepcan	Peptídeo	HPV 16 E6	Regresso histológico em 52% dos pacientes, aumento de células T Th1 após vacinação.	Greenfield et al., 2015
VGX-3100	DNA	HPV 16 e 18 E6 e E7	Regressão histológica e virológica de 40,2%, sem eventos adversos graves.	Trimble et al., 2015
pNGVL4a-CRT/E7	DNA	HPV 16 E7	Pacientes com 69% de eventos adversos leves, nenhum evento adverso grave. Não houve diferenças nas cargas virais pré e pós-vacinação. 30% dos pacientes com regressão histológica para CIN 1.	Álvarez et al., 2016
Pepcan	Peptídeo	HPV 16 E6	Sem toxicidades limitantes de dose. Regressão histológica de 50% nas doses de 50 µg e 100 µg. Redução da carga viral do HPV 16.	Coleman et al., 2016
GX-188E	DNA	HPV 16 e 18 E6 e E7	Eventos adversos em 94,4% e 100% em certos grupos. Regressão histopatológica em 67% dos pacientes, com 77% eliminando o HPV. Respostas ELISpot indicaram eficácia.	Choi et al., 2020

2.6 – BIOINFORMÁTICA E MULTIEPÍTOPOS.

Uma vacina terapêutica eficaz deve induzir uma imunidade celular robusta específica para o antígeno, visando as células cancerígenas, principalmente através da ativação de células T citotóxicas CD8 +. Um epítopo é a menor parte de uma proteína, capaz de desencadear resposta imunológica, logo, são fundamentais para o processo de reconhecimento e ataque celular, eles são pequenos peptídeos derivados de antígenos associados a vírus ou tumores e apresentados por moléculas de antígeno leucocitário humano classe I. Os epítomos ideais são aqueles intensamente expressos apenas nas células malignas e envolvidos na patogênese tumoral, como as oncoproteínas do HPV e as proteínas *Early*. Portanto, a descoberta de epítomos de CTL altamente imunogênicos específicos para tumores entre essas proteínas é uma parte essencial do projeto de vacina terapêutica, limitando a exposição a peptídeos inespecíficos não imunogênicos. No entanto, a seleção de epítomos de CTL ideais é problemática devido ao enorme polimorfismo e à diversidade de cobertura populacional dos alelos HLA-I (Aditama et al., 2024; Panahi et al., 2020).

Nesse contexto, o uso desses epítomos como terapêutica tem se mostrado atraente para prevenir ou tratar alguns tipos de doenças infecciosas e cânceres devido a *vantagens* como alta seletividade, capacidade multivalente, fácil produção, alta biossegurança, fácil transporte e estabilidade. Além disso, esses peptídeos podem ser sintetizados com ligações resistentes a proteases conhecidas ou modificações pós-traducionais para melhorar sua estabilidade *in vivo*, absorção celular, processamento e apresentação. Contudo, as principais *desvantagens* das vacinas baseadas em peptídeos são a baixa imunogenicidade e a restrição de HLA (Panahi et al., 2020).

Considerando essas limitações, o direcionamento de um único epítopo é geralmente insuficiente para estabelecer terapias duradouras e suprimir o crescimento de variantes de perda de antígeno. Assim, a maioria dos esforços tem sido direcionada para o uso de múltiplos epítomos em formulações de vacinas. O uso de polipeptídeos contendo vários epítomos demonstrou sucesso considerável em estudos, pois assim como as vacinas de peptídeos longos, permite a ligação ao MHC

por vias intracelulares, resultando em uma apresentação de epítomos mais durável e respostas imunes mais robustas. (Guo et al., 2024; Panahi et al., 2020; Pandey et al., 2018)

Esse processo só é possível com a conciliação da imunoinformática, que é uma área interdisciplinar que combina imunologia e bioinformática para estudar e modelar o sistema imunológico por meio de ferramentas computacionais, desempenhando papel essencial no desenvolvimento de vacinas ao possibilitar a identificação e análise de epítomos protetores com base em estudos genômicos de patógenos (Kardani et al., 2020). A imunoinformática, utilizando triagens de epítomos disponíveis, através de banco de dados, consegue relacionar diversos dados e chegar em epítomos com melhor eficiência contribuindo para prever toxicidade, autoimunidade e meia-vida de proteínas ou peptídeos, para tais resultados análises como processamento intracelular, clivagem proteasomal e ligação ao MHC que são fundamentais na concepção de vacinas polipeptídicas, são obtidos através de diversas ferramentas de imunoinformática (Bahrami et al., 2019).

Desse modo, vacinas com construções de Multiepítomos, desenvolvidas com o suporte da imunoinformática, têm se mostrado altamente eficientes ao promover respostas imunes específicas e robustas, além de minimizar riscos como autoimunidade e reações adversas. Essa estratégia inovadora acelera o desenvolvimento de vacinas e amplia a eficácia no combate ao câncer, como o HPV e a doenças infecciosas virais (De Groot et al., 2020). Os avanços em tecnologias de sequenciamento de nova geração e em análises preditivas *in silico* potencializam a descoberta de novos imunoterápicos. Contudo, estudos *in vitro* e *in vivo* são fundamentais para validar a segurança e a eficácia dessas vacinas, consolidando seu papel promissor em terapias preventivas e terapêuticas (Kardani et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Construir um antígeno sintético multiepítopo utilizando as proteínas *Early E5*, *E6* e *E7* do Papilomavírus Humano como base de desenvolvimento de estratégia

vacinal terapêutica contra o câncer de colo de útero a partir de abordagens de imunoinformática.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

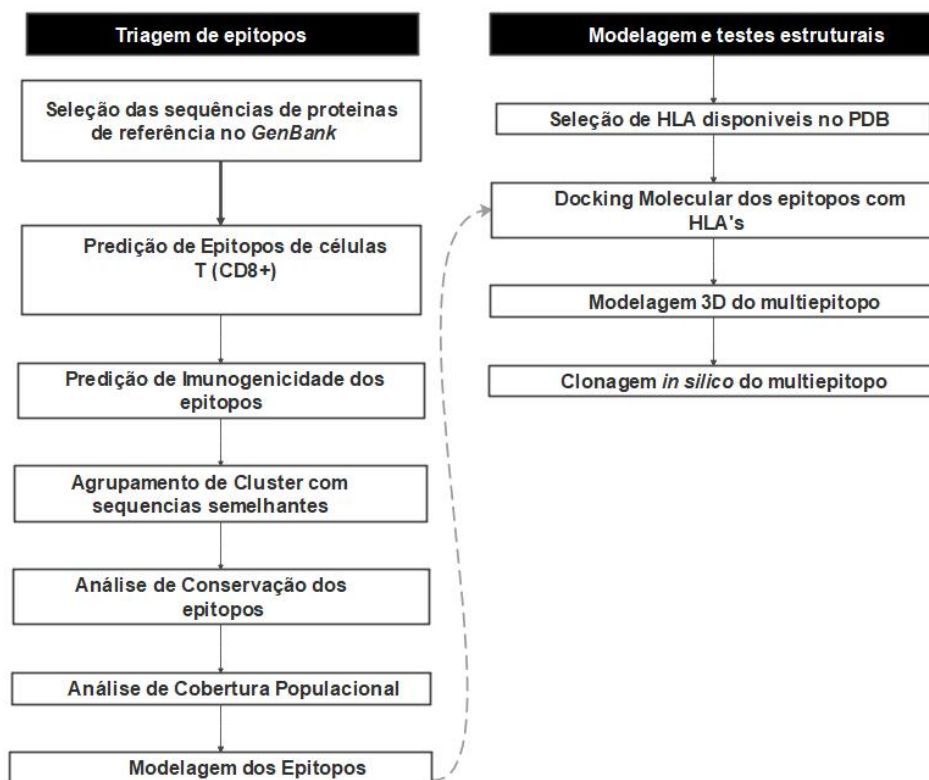
- Predizer os epítomos das proteínas *Early* do HPV para células T;
- Avaliar a imunogenicidade, conservação entre variantes e cobertura populacional dos epítomos;
- Simular a ancoragem molecular das interações epítomo-HLA;
- Analisar o potencial alergênico, antigênico e propriedades físico-químicas da construção;
- Modelar o antígeno sintético.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O estudo realizado foi conduzido *in silico*, sendo dividido em uma etapa inicial “Triagem de Epítomos”, seguida pela fase de “Modelagem e testes estruturais”. A organização gráfica desse processo está representada na Figura 6, destacando cada etapa e suas interações ao longo do desenvolvimento do modelo.

Figura 6 – Fluxograma delimitando as diferentes etapas contidas nas construções dos antígenos sintéticos. O estudo é dividido em duas fases principais: a fase de triagem de epítomos, que inclui a identificação das proteínas dos HPVs de interesse e a seleção dos melhores epítomos após análises, e a fase de modelagem e testes estruturais, que abrange a modelagem das moléculas de HLA, testes de *docking*, modelagem do antígeno e clonagem *in silico*.



Fonte: Autoria própria

4.2 CRIAÇÃO DE BANCO DE DADOS

Este trabalho trata-se de um estudo *in silico* realizado com base em informações de sequências proteicas disponíveis em bancos de dados públicos. As proteínas de interesse incluem as proteínas oncogênicas *Early* (E5, E6 e E7) dos papilomavírus humanos (HPVs) de alto risco, especificamente os tipos 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58, totalizando 21 proteínas.

As sequências proteicas foram obtidas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), acessível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. A busca inicial focou nos genes de referência; na ausência destes, foram selecionadas sequências que apresentavam genoma completo. Posteriormente, as sequências das proteínas de interesse foram extraídas utilizando o Protein ID e baixadas no formato FASTA.

Uma planilha foi elaborada para compilar informações relevantes sobre características como toxicidade, imunogenicidade, conservação, cobertura populacional, *docking* molecular, dinâmica molecular, alergenicidade, antigenicidade e propriedades físico-químicas. Os dados obtidos foram triados por meio de análises subsequentes, aplicando critérios de inclusão que determinaram quais informações seriam consideradas para análises posteriores.

4.3 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOSS DE CELULAS T

A predição de epítopos específicos para células T CD8 + foi realizada utilizando o programa *MHC-I Binding Prediction*, disponível na ferramenta IEDB (<http://tools.iedb.org/mhci/>). Este programa fundamenta-se nas etapas da via de processamento e apresentação de antígenos, permitindo a identificação de epítopos que possam interagir eficientemente com as moléculas de MHC classe I.

Para a análise, empregou-se o NetMHCpan 4.1 EL, que utiliza redes neurais convolucionais (CNNs) para prever as afinidades de ligação entre peptídeos e moléculas de MHC. Essas redes foram treinadas com um extenso banco de dados de interações peptídeo-MHC, facilitando a identificação de padrões nas sequências dos peptídeos e das moléculas de MHC. Os resultados são expressos em valores de

afinidade, sendo a IC50 a medida mais comum utilizada, que representa a concentração do peptídeo necessária para inibir 50% da ligação ao MHC; valores mais baixos de IC50 indicam uma maior afinidade de ligação.

Após a predição, o modelo gera um escore geral que reflete o processamento proteossomal, a eficiência do transporte mediado pela TAP e a ligação do peptídeo ao MHC classe I. Os resultados são apresentados em um valor de percentil ranking, onde epítomos com um percentil abaixo de 0,5 são selecionados para análises subsequentes, indicando uma forte ligação com os MHCs classe I (Greenbaum et al., 2011; Weiskopf et al., 2012).

4.4 ANÁLISES DOS EPÍTOPOS

Para identificar os epítomos com maior capacidade de desencadear uma resposta imunológica, foi utilizada a ferramenta Class I Immunogenicity do IEDB. Esta ferramenta fornece um modelo preditivo que avalia a imunogenicidade de peptídeos de classe I, baseando-se em características estruturais e sequenciais que determinam a interação entre os peptídeos e as moléculas do MHC de classe I. O modelo é projetado para estimar a capacidade de um peptídeo em induzir uma resposta imunológica, priorizando aqueles com maior potencial imunogênico.

Na análise, foi aplicado um filtro para selecionar apenas os epítomos mais imunogênicos, ou seja, aqueles que apresentaram valores positivos de escore, indicando uma maior probabilidade de induzir uma resposta imune. Os peptídeos com escores negativos foram descartados, pois esses valores sugerem baixa ou nenhuma capacidade de ativar uma resposta imunológica (Calis et al., 2013)

4.5 AGRUPAMENTO DE SEQUENCIAS SEMELHANTES

Com o objetivo de evitar a predição de múltiplos epítomos na mesma região, foi realizada uma análise de agrupamento de sequências semelhantes. Utilizando a ferramenta Epitope *cluster* Analysis, disponível no IEDB (<http://tools.iedb.org/cluster/>), os epítomos preditos foram organizados em *clusters*, com base na identidade de

sequência. Um *cluster* é definido como um grupo de sequências que apresentam alta similaridade, nesse caso foi estabelecido um valor maior ou igual a 80%.

A ferramenta funciona comparando as sequências dos epítomos e agrupando aquelas que compartilham uma alta identidade, permitindo a visualização de relações entre diferentes epítomos. Essa análise é crucial para identificar redundâncias e garantir que cada epítomo representado seja único e potencialmente distinto em termos de resposta imunológica. Para cada *cluster* formado, um epítomo representante foi selecionado para análises posteriores, com base no maior valor de imunogenicidade entre os epítomos do respectivo *cluster* (Dhanda et al., 2018). Essa abordagem assegura que os epítomos escolhidos para investigações futuras tenham um potencial imunogênico otimizado, contribuindo para o desenvolvimento de vacinas e terapias mais eficazes.

4.6 ANÁLISE DE CONSERVAÇÃO DE EPÍTOPOS

A análise de conservação dos epítomos foi realizada utilizando a ferramenta Epitope Conservancy Analysis, disponível no IEDB (Bui et al., 2007). Esta ferramenta permite comparar a sequência dos epítomos preditos com as sequências de proteínas de diferentes genótipos de alto risco do HPV (do inglês *high risk HPV* - hrHPV), identificando quais epítomos foram mais conservados entre eles. A comparação foi feita com base nas sequências preditas das proteínas *Early* (E5, E6 e E7) dos genótipos de HPV 16, 18, 45, 31, 33, 58 e 52, com os outros tipos de alto risco, como a 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82.

A ferramenta realiza o alinhamento dessas sequências e calcula a porcentagem de identidade (ou conservação) entre elas. Com base nisso, os epítomos que apresentaram um grau mínimo de 70% de conservação em relação aos diferentes genótipos do hrHPV foram selecionados para as próximas etapas da análise. Esse critério garantiu que apenas os epítomos mais conservados, ou seja, aqueles que se mantiveram similares entre os diferentes genótipos, fossem considerados. Além disso, para evitar redundâncias e garantir a precisão da análise, foi utilizado o critério de ao menos dois epítomos para cada comparação, assegurando que um epítomo não fosse pareado com ele mesmo. Os epítomos que

atenderam ao critério de conservação mínima de 70% passaram para a fase seguinte do processo.

4.7 ANALISE DE COBERTURA POPULACIONAL.

Foi realizada uma análise para determinar a fração de indivíduos que poderiam responder ao conjunto de epítomos selecionados até o presente momento, considerando os HLAs mais frequentes no mundo. Para isso, foi feita uma combinação entre cada epítomo e sua proporção populacional alélica, permitindo estimar a cobertura populacional do conjunto de epítomos.

Essa análise foi conduzida utilizando a ferramenta Population Coverage, disponível no IEDB Analysis Resource (<http://tools.iedb.org/population/>). A ferramenta calcula a fração de indivíduos que se espera que respondam aos epítomos com base nas frequências alélicas do HLA em diferentes populações. Por meio da inserção dos epítomos e suas restrições de MHC, a ferramenta fornece uma estimativa detalhada da cobertura populacional, sendo essencial para avaliar o potencial de aplicação global de vacinas ou diagnósticos baseados em epítomos (BUI et al., 2006). Desse modo, foram selecionados no final um representantes de cada proteína *Early*, para cada genótipo de HPV, de acordo com o maior grau de conservação.

4.8 ANCORAGEM MOLECULAR (*DOCKING*)

Os HLAs que possuíam estruturas cristalográficas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) (Berman et al., 2000) foram coletados para análise. O PDB é um banco de dados que armazena informações tridimensionais de macromoléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos, permitindo o acesso a estruturas cristalográficas para estudos computacionais. Paralelamente, as estruturas dos epítomos foram modeladas utilizando o PEP-FOLD 3.5, uma ferramenta de predição de novo para sequências peptídicas de 5 a 50 aminoácidos. Essa ferramenta utiliza um modelo oculto de Markov para simular diversas conformações de cadeias polipeptídicas sobrepostas, gerando 100 simulações por predição para cada epítomo.

Foi selecionado o melhor modelo, esse se dá com base no valor de energia livre de Gibbs, onde o modelo com a menor energia indica a conformação mais estável e, portanto, a mais provável de ocorrer em condições fisiológicas (Lamiable et al., 2016; Alland et al., 2005).

Inicialmente, foi realizado o *redocking* para identificar a fenda de ligação e suas dimensões nos HLAs disponíveis no PDB. O *redocking* é uma técnica que verifica se o local de ligação identificado corresponde ao observado experimentalmente. Posteriormente, as moléculas HLA foram tratadas utilizando o *AutoDockTools*, que removeu os ligantes e moléculas de água associadas (Tabela 3), enquanto os heteroátomos foram eliminados manualmente (Scripps Research, 2021). Os arquivos no formato PDB foram convertidos para o formato PDBQT usando o *Open Babel*, uma ferramenta que facilita a preparação dos arquivos para *docking* molecular.

O acoplamento molecular entre cada epítipo e seus respectivos HLAs foi realizado utilizando o *AutoDock Vina*, disponível no software PyRx (Dallakyan; Olson, 2015). O *AutoDock Vina* calcula a afinidade de ligação entre os epítopos e os HLAs com base em um algoritmo que considera interações energéticas, como forças eletrostáticas e hidrofóbicas. O valor de afinidade é expresso em kcal/mol, onde valores mais negativos indicam maior estabilidade da interação entre o epítipo e o HLA. Ao final do processo, foi estabelecido um valor de ligação para cada epítipo com base no *docking* realizado nas fendas dos HLAs disponíveis, e sua estrutura foi visualizada por meio do *Discovery Studio* (Biovia, 2021).

Tabela 3 - Informações dos HLAs utilizados no *docking* molecular dos epítomos das construções vacinais.

HLA	Descrição	PDB ID	Estruturas Removidas
HLA-A*23:01	Não encontrado no PDB	-	-
HLA-A*24:02	Estrutura cristalográfica do HLA-A*24:02 com peptídeo derivado da nucleoproteína do vírus influenza A	7JYV	Cadeias: C, D, E Resíduos: Mg, HOH Detalhe: Cadeia C: Peptídeo da influenza, YFSPiRVTF
HLA-B*08:01	Estrutura cristalográfica do HLA-B*08:01 em complexo com peptídeo derivado do EBV	7NUI	Cadeias: C, D, E, F, G, H Resíduos: EDO, PEG, HOH Detalhe: Cadeia D: Peptídeo
HLA-B*51:01	Estrutura do HLA-B*51:01 complexado com epítipo imunodominante do HIV KM1 (LPPVVAKEI)	1E27	Cadeias: C Resíduos: HOH Detalhe: Cadeia C: Peptídeo do HIV-1 LPPVVAKEI
HLA-B*07:02	Estrutura cristalográfica do HLA-B*07:02 em complexo com peptídeo derivado do HIV	5EO0	Cadeias: C Resíduos: HOH Detalhe: Cadeia C: Peptídeo RFL9
HLA-B*15:01	Estrutura cristalográfica do HLA-B*15:01 em complexo com peptídeo NQK-OC43	8ELG	Cadeias: C, D, E, F, G Resíduos: ACT, HOH Detalhe: Cadeia C: Peptídeo NQK-OC43
HLA-A*30:02	Não encontrado no PDB	-	-
HLA-A*01:01	Estrutura cristalográfica do HLA-A*01:01 em complexo com peptídeo derivado do HIV	4NQX	Cadeias: C, E, G, I, K, M, N, O, P, Q, R, D, F, H, J, L Resíduos: HOH
HLA-B*35:01	Estrutura cristalográfica do HLA-B*35:01 em complexo com peptídeo da proteína Spike S2	7M8U	Cadeias: C, D, E, F, G, H Resíduos: Na, PO4, HOH Detalhe: Cadeia C: Peptídeo da proteína Spike S2
HLA-B*53:01	Estrutura cristalográfica do HLA-B*53:01 em complexo com peptídeo derivado do citomegalovírus	7R7V	Cadeias: C, D, E Resíduos: GOL, HOH Detalhe: Cadeia C: GLN-ala-ser-GLN-glu-val-lys-asn-TRP
HLA-A*02:01	Estrutura cristalográfica do HLA-A*02:01 em complexo com peptídeo derivado da Spike do SARS-CoV-2	7UM2	Cadeias: C, D, E, F Resíduos: CD, NA, ZN, HOH Detalhe: Cadeia C: Peptídeo S417-425 mutante K417T
HLA-A*02:03	Estrutura cristalográfica do HLA-A*02:03 em complexo com peptídeo derivado do HIV	3OX8	Cadeias: D, E, C, F Resíduos: HOH
HLA-A*02:06	Estrutura cristalográfica do HLA-A*02:06 em complexo com peptídeo do antígeno pré-core do HBV	3OXR	Cadeias: C Resíduos: HOH Detalhe: Cadeia C: Peptídeo 10MER
HLA-A*32:01	Não encontrado no PDB	-	-
HLA-A*68:02	Não encontrado no PDB	-	-
HLA-A*11:01	Estrutura cristalográfica do HLA-A*11:01 em complexo com peptídeo da proteína Spike S1	7M8T	Cadeias: C, D, F, G, H, I, J Resíduos: CA, CL, GOL, NA, SO4 Detalhe: Cadeia C: Peptídeo da Spike S1
HLA-A*03:01	Estrutura cristalográfica do HLA-A*03:01 em complexo com peptídeo PIK3CA	7L1B	Cadeias: C, D, E Resíduos: GOL, HOH Detalhe: Cadeia C: Peptídeo PIK3CA)

HLA	Descrição	PDB ID	Estruturas Removidas
HLA-A*68:01	Estrutura cristalográfica do HLA-A*68:01 em complexo com peptídeo NP145-156 da Influenza A	6PBH	Cadeias: C, D, E, F, G, H, I Resíduos: IOD, MG, SO4, HOH Detalhe: Cadeia C: Peptídeo NP145-156
HLA-A*26:01 HLA-B*58:01	Não encontrado no PDB Estrutura cristalográfica do HLA-B*58:01 em complexo com peptídeo derivado do HIV	- 5V5L	- Cadeias: C, D, E, F Resíduos: HOH
HLA-B*57:01	Estrutura cristalográfica do HLA-B*57:01 com peptídeo modificado do HIV RKV-Kyn	6BXP	Cadeias: C, D Resíduos: ACT, KYN, HOH Detalhe: Cadeia C: Peptídeo RKV-Kyn

Fonte: Autoria Própria

4.9 CONSTRUÇÃO DO MULTIEPÍTOPO

O multiepítipo foi construído incluindo um epítipo final para cada proteína *Early* (E5, E6 e E7) dos genótipos de alto risco de HPV escolhidos como referência: 16, 18, 45, 31, 33, 58 e 52, totalizando 21 epítipos. A seleção desses epítipos priorizou os melhores resultados obtidos nos testes imunológicos e nas análises computacionais de predição de epítipos, incluindo triagens de conservação, imunogenicidade e cobertura populacional, sendo triados até a etapa final

4.9.1 Inserção de Enzimas de Restrição

Na construção final da sequência, foram adicionadas enzimas de restrição para facilitar o recorte específico dos epítipos de cada proteína *Early*. As enzimas escolhidas foram *NheI* no início da sequência, *XhoI* no final, *Sall* entre os epítipos de E5 e E6, e *SmaI* entre os epítipos de E6 e E7. Essas enzimas permitem a manipulação precisa do DNA em experimentos futuros. A sequência das enzimas foi obtida utilizando o programa *ApE* (*A Plasmid Editor*), que facilita a visualização e edição de sequências genéticas. O *ApE* permite identificar locais de restrição e gerar sequências otimizadas para clonagem (Davis; Jorgensen, 2022)

4.9.2 Adição da *tag* de Histidinas

Para auxiliar o reconhecimento do multiepítopo durante a produção proteica, foi adicionado um *tag* de 7x histidinas. A *tag* de 7x histidinas facilita a purificação eficiente da proteína alvo, permitindo a remoção de contaminantes de forma rápida. Além disso, possibilita a detecção da proteína em ensaios, como *Western blotting*, utilizando anticorpos específicos contra a histidina. Por fim, sua adição geralmente não interfere na estrutura ou função da proteína, preservando sua atividade biológica (Lindner et al., 2008).

4.9.3 Inserção de *linkers* e adjuvantes

Para aumentar a eficiência da construção foram adicionados *linkers* e adjuvantes. Entre os epítomos, foi adicionada a sequência AAY, que tem como função manter a flexibilidade entre os peptídeos e facilitar o processamento proteolítico durante a apresentação antigênica. Esses *linkers* são conhecidos por melhorar a apresentação dos epítomos às células T (Pandey et al., 2018). Para potencializar a resposta imunológica, foi incluído o adjuvante TAT, um peptídeo derivado do HIV-1 que facilita a internalização celular e melhora a entrega intracelular do antígeno. O TAT é conhecido por aumentar a captação pelos APCs (células apresentadoras de antígenos) e estimular uma resposta imunológica mais robusta (Frankel; Pabo, 1988; Yang et al., 2019).

4.9.4 Modelagem da Estrutura

Após a conclusão da construção da sequência, a modelagem estrutural foi realizada utilizando o software *ChimeraX*, que permite a visualização e manipulação de estruturas tridimensionais de proteínas. *ChimeraX* integra ferramentas avançadas para análise estrutural e modelagem molecular (PETTERSEN et al., 2021). Dentro do *ChimeraX*, foi utilizado o servidor *AlphaFold 2*, que aplica redes neurais profundas para prever com alta precisão as estruturas proteicas com base na sequência de aminoácidos (Jumper et al., 2021). A modelagem resultou na obtenção da estrutura

tridimensional da proteína multiepítopo, que foi então salva no formato “.pdb” e submetida ao servidor online *PDB Sum Generate*. Este servidor gerou o gráfico de *Ramachandran*, que avalia a qualidade do modelo com base na posição dos aminoácidos, indicando que uma proteína com mais de 90% dos seus resíduos em regiões favoráveis apresenta boa qualidade estrutural. Além disso, foi realizada a predição da estrutura secundária da proteína, possibilitando a análise das regiões prováveis de hélices alfa e folhas beta, bem como a avaliação do fator G, que analisa possíveis distorções nas interações covalentes e nos ângulos diedros da cadeia principal (PDBsum Generate - EMBL-EBI, 2025).

4.10 TESTES DE SEGURANÇA E ESTABILIDADE DO MULTIEPÍTOPOS

Por fim, foram realizados os testes de antigenicidade, alergenicidade, toxicidade e estabilidade estrutural utilizando os programas *VaxiJen*, *Allertop*, *ToxinPred* e *ProtParam*, respectivamente. Esses testes desempenham funções específicas na avaliação da sequência da construção final do multiepítopo.

O *VaxiJen* é um servidor que prevê a antigenicidade de proteínas com base em suas propriedades físico-químicas, classificando-as como potenciais antígenos protetores com precisão entre 70% e 89% (Ding et al., 2007; Pirrotta et al., 2007). O *Allertop* avalia a alergenicidade, identificando epítomos que podem causar reações alérgicas, contribuindo para a seleção de proteínas seguras para uso em vacinas (Daniel et al., 2015). O *ToxinPred* analisa as sequências proteicas para prever a toxicidade, assegurando que os candidatos sejam seguros para aplicação em vacinas e terapias (Kumar et al., 2018). Por sua vez, o *ProtParam*, disponível na plataforma *ExPASy*, permite a análise de parâmetros físico-químicos das proteínas, incluindo peso molecular, ponto isoelétrico, composição de aminoácidos e índice de instabilidade, o que é crucial para avaliar a viabilidade da proteína em condições experimentais (Gasteiger et al., 2005; *ExPASy*, 2025).

Esses testes são fundamentais para garantir que a construção final do multiepítopo não apenas tenha potencial imunogênico, mas também seja segura e estável para aplicações futuras.

4.11 CLONAGEM *IN SÍLICO*

A clonagem *in silico* foi realizada utilizando o software *SnapGene*, uma ferramenta que simula processos de clonagem molecular. Com a função *Reverse Translation* do *SnapGene*, a sequência de aminoácidos do multiepítopo foi convertida em uma sequência de nucleotídeos codificadora, otimizada para expressão em sistemas biológicos. O multiepítopo foi inserido no vetor plasmidial pVAX1 (Invitrogen), adequado para expressão em células de mamífero, e enzimas de restrição previamente adicionadas foram reconhecidas pelo software, confirmando a posição e reconhecimento das enzimas (SnapGene, 2025).

5 RESULTADOS

5.1 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS E IMUNOGENICIDADE

Os resultados da predição inicial dos epítomos para as proteínas *Early* dos genótipos de interesse (16, 18, 45, 31, 33, 58 e 52) estão apresentados na Tabela 4. Os epítomos que apresentaram um valor de *percentile ranking* inferior a 0,5 foram considerados promissores, indicando um bom potencial de ligação, conforme avaliado pelo método Net MHCp 4.1 EL (Jensen et al., 2020). A análise revelou um total de 1.224 epítomos distribuídos entre os genótipos analisados, o HPV-16 e o HPV-18 se destacaram com os maiores números de epítomos preditos, totalizando 173 e 171, respectivamente. Esses dados reforçam o papel central desses genótipos como alvos prioritários, dada sua maior diversidade e relevância clínica. No entanto, a análise de epítomos para outros genótipos também é essencial para garantir uma cobertura imunológica mais ampla.

Entre as proteínas analisadas, a E6 apresentou o maior número de epítomos preditos (655 epítomos), seguida pela E7 (295 epítomos) e pela E5 (274 epítomos). Esses resultados destacam a importância da proteína E6 como um alvo imunológico relevante, mas também indicam o potencial das proteínas E5 e E7 como componentes adicionais em estratégias imunológicas. Em seguida foi realizado o

teste de imunogenicidade com os epítomos obtidos na fase de predição, essa fase é crucial no desenvolvimento de vacinas. A Tabela abaixo (tabela 4) revela que dos 1224, um total de 753 epítomos apresentaram imunogenicidade superior a zero para diferentes genótipos de HPV. Assim como para a predição, o HPV-16 se destacou em números, seguido pelo HPV-18.

Tabela 4 - Resultados da quantidade de Epítomos resultantes em cada etapa de triagem: predição, imunogenicidade, agrupamento de sequencias semelhantes e conservação.

Tipo de HPV	Predição	Imunogenicidade	cluster	Conservação
HPV - 16				
E5	49	35	12	5
E6	80	35	10	8
E7	44	37	6	2
HPV - 18				
E5	35	24	5	2
E6	103	83	16	14
E7	33	19	5	3
HPV - 45				
E5	24	11	4	2
E6	86	67	15	14
E7	43	24	5	4
HPV - 31				
E5	42	23	8	2
E6	114	72	14	9
E7	45	22	6	5
HPV - 33				
E5	39	17	7	6
E6	77	46	12	11
E7	42	34	5	5
HPV - 58				
E5	37	21	10	8
E6	97	48	12	11
E7	46	32	6	4
HPV - 52				
E5	48	15	5	3
E6	98	70	16	14
E7	42	18	4	3
Total	1224	753	183	135

Fonte: Autoria Própria

5.2 AGRUPAMENTO, COBERTURA E CONSERVAÇÃO DE SEQUÊNCIAS

Após o processo de imunogenicidade, os epítomos foram submetidos à análise de semelhança de sequência e formação de *clusters* por meio da *Epitope cluster Analysis* do IEDB. Para a nossa análise, foi aplicado um valor de corte de 80% de semelhança para os 753 Epítomos triados, o que significa que apenas os epítomos que compartilham pelo menos 80% de identidade em suas sequências foram agrupados e entre cada grupo foi selecionado um representante para cada.

A Tabela apresentada (tabela 4) mostra a quantidade de *clusters* representativos obtidos para cada tipo de HPV, sendo identificados 183 *clusters*. A redução percentual na quantidade total de epítomos foi de aproximadamente 75,70%. Essa diminuição significativa é esperada, pois o processo de *clustering* elimina sequências redundantes e aquelas com alta similaridade, resultando em uma representação mais concisa dos epítomos, a utilização da ferramenta do IEDB para essa análise é uma abordagem valiosa que contribui para a eficácia das estratégias vacinais. (Vitale et al., 2017).

Os 183 epítomos selecionados foram submetidos a uma análise de conservação, na qual foi avaliada a identidade entre diferentes tipos de HPV. A comparação foi realizada entre os epítomos triados e os genomas dos HPVs de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82). Para evitar redundâncias, foi adotado o critério de dois epítomos, conforme descrito na metodologia, a lista completa de sequências de epítomos analisadas está disponível no Apêndice A. A Tabela 4 apresenta os valores obtidos para a quantidade de epítomos com uma conservação superior a 70% de identidade mínima. A análise dos resultados revela uma diversidade significativa de epítomos conservados entre os diferentes genótipos, fator essencial para o desenvolvimento de vacinas eficazes. Epítomos conservados têm maior probabilidade de serem reconhecidos pelo sistema imunológico, mesmo em variantes distintas do vírus. A menor quantidade de epítomos conservados em alguns genótipos pode sugerir uma menor variabilidade ou uma maior homogeneidade nas sequências proteicas desses tipos virais.

Com base nos epítomos identificados na fase de conservação, a análise de cobertura populacional foi conduzida conforme a metodologia descrita no tópico correspondente. Essa análise possibilitou a identificação dos epítomos com as maiores taxas de cobertura populacional e o maior número de alelos HLA disponíveis, critérios fundamentais para a seleção dos epítomos representativos, pois contribui para a eficácia da vacina em uma população geneticamente diversa.

Após a análise dos 135 epítomos foi decidido que seria selecionado apenas as duas maiores coberturas de cada proteína do seu genótipo, disponível no apêndice B , enquanto na Tabela 5, é possível observar o epítomo de maior cobertura selecionado, juntamente com seus ligantes.

Tabela 5 – Lista dos Epítomos com maior cobertura populacional. Epítomoss com seus HLAs ligantes, para cada proteína *Early* de cada genótipo de HPV. No caso do epítomo “KLPDLCTEL” da proteína E6 do HPV 45, foi selecionada a segunda maior cobertura, devido à repetição do mesmo epítomo em outro genótipo, que já havia sido escolhido. O mesmo critério foi aplicado para o epítomo “RFHNISGRW” da proteína E6 do HPV 58.

Tipo de HPV	Proteína	Epítomo	Alelos dos Antígenos Leucocitários Humano (HLAs)	Cobertura %
HPV - 16	E5	LFLIHTHARF	HLA-A23:01, HLA-A24:02	26,18
	E6	DPQERPRKL	HLA-B08:01, HLA-B51:01, HLA-B*07:02	29,13
	E7	LQPETTDLY	HLA-B15:01, HLA-A30:02, HLA-A*01:01	26,34
HPV - 18	E5	TSPATAFTVY	HLA-B35:01, HLA-A01:01, HLA-B*53:01	26,3
	E6	KLPDLCTEL	HLA-A02:01, HLA-A02:03, HLA-A*02:06	41,35
	E7	TLQDIVLHL	HLA-A02:01, HLA-A02:06, HLA-A02:03, HLA-A32:01, HLA-A*68:02	46,72
HPV - 45	E5	SPLTAFVY	HLA-B35:01, HLA-B53:01	10,84
	E6	KLPDLCTEL	HLA-A02:01, HLA-A02:03, HLA-A*02:06	41,35
	E6	NSVYGETLEK	HLA-A11:01, HLA-A03:01, HLA-A*68:01	35,75
	E7	TLQEIVLHL	HLA-A02:01, HLA-A02:03, HLA-A02:06, HLA-A32:01, HLA-B*08:01	50,68
HPV - 31	E5	IPLFVIHTH	HLA-B35:01, HLA-B53:01	10,84
	E6	FAFTDLTIVY	HLA-B35:01, HLA-A26:01, HLA-B53:01, HLA-B15:01, HLA-A*01:01	37,17
	E7	TLQDYVLDL	HLA-A02:01, HLA-A02:06, HLA-A*02:03	41,35
HPV - 33	E5	LLRPLLSI	HLA-A02:03, HLA-B08:01, HLA-A32:01, HLA-A02:01	49,37
	E6	RFHNISGRW	HLA-A23:01, HLA-A24:02, HLA-A*32:01	30,13
	E7	TLKEYVLDL	HLA-B08:01, HLA-A02:03, HLA-A*02:01	46,19
HPV - 58	E5	VLSISYAW	HLA-A32:01, HLA-B58:01, HLA-B57:01, HLA-B53:01	13,86
	E6	RFHNISGRW	HLA-A23:01, HLA-A24:02, HLA-A*32:01	30,13
	E6	NYSLYGETL	HLA-A24:02, HLA-A23:01	26,18
	E7	TLREYILD	HLA-B08:01, HLA-A02:03, HLA-A*02:01	46,19
HPV - 52	E5	SPFKVFFLY	HLA-B35:01, HLA-B53:01, HLA-A26:01, HLA-A30:02	18,13
	E6	TLHELCEVL	HLA-A*02:01	39,08
	E7	TSNYYIVTY	HLA-A30:02, HLA-A01:01, HLA-A26:01, HLA-B35:01, HLA-B15:01, HLA-B58:01, HLA-A32:01, HLA-B57:01	45,21

Fonte: Autoria Própria

5.3 ACOPLAMENTO MOLECULAR

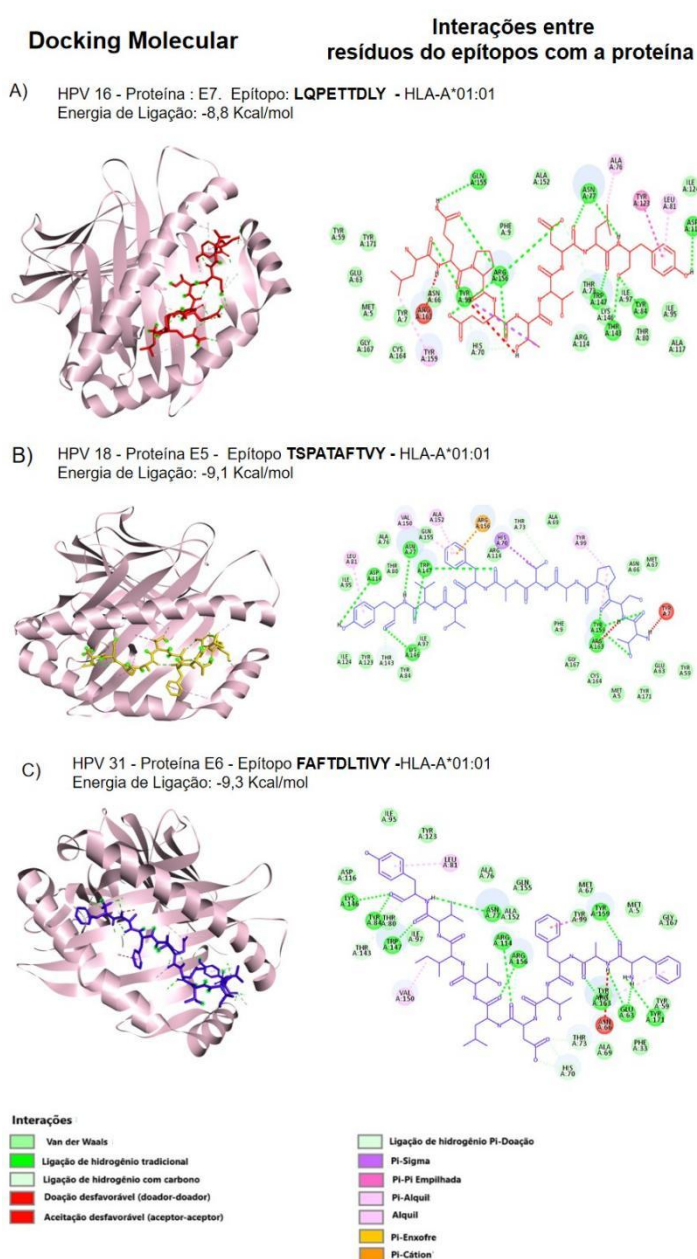
Após a análise da cobertura populacional, foi necessário selecionar um epítopo representativo. Essa escolha levou em consideração não apenas o tamanho da construção final da proteína, que não deveria ser excessivamente grande, devido a questões relacionadas à síntese, estabilidade e viabilidade futura (Ferreira et al., 2000), mas também a eficiência do processo de *docking* molecular.

Assim, optou-se por utilizar o epítopo com a maior cobertura e o maior número de HLAs ligantes. Os epítopos selecionados e seus respectivos valores triados estão listados no Apêndice C. Essa abordagem garantiu que os epítopos escolhidos apresentassem o maior potencial para induzir uma resposta imune eficaz em uma ampla gama de populações.

Com os epítopos e os HLAs ligantes definidos, foi necessário realizar uma busca pelos HLAs disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB), conforme detalhado na Tabela 3. Também foi necessária a modelagem e o tratamento dos epítopos escolhidos, conforme descrito na metodologia.

Os resultados dos valores de ligação entre cada epítopo estão representados no Apêndice D, enquanto a visualização do *docking* de todos os epítopos pode ser conferida no Apêndice E. A análise demonstrou que o encaixe do epítopo na fenda dos HLAs ocorreu conforme esperado, sendo definido dentro da fenda com valores de afinidade favoráveis. Em geral, um valor de energia de ligação (*binding energy*) negativo é considerado indicativo de uma interação favorável entre o epítopo e a molécula HLA. Valores abaixo de -7 kcal/mol são frequentemente interpretados como indicativos de interações fortes, enquanto valores entre -5 e -7 kcal/mol sugerem interações moderadas (Trott; Olson, 2010). Todos os valores obtidos estiveram abaixo de -7, indicando forte ligação entre os epítopos e os HLAs. A Figura 7 ilustra essas interações, com destaque para as ligações previstas entre os epítopos e os HLAs.

Figura 7 – Representação do *docking* Molecular entre os epítomos selecionados e os HLAs representantes. À esquerda, na seção intitulada "*docking* Molecular" mostra a representação gráfica da ancoragem (*docking*) molecular do epítopo posicionado na fenda de ligação do HLA. O valor indicado em kcal/mol representa a energia liberada após ocorrer a ligação entre a macromolécula (HLA) e o seu ligante (epítopo). Os HLAs estão destacados em rosa claro e os epítomos da proteína E7, E5 e E6 estão destacados em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. Enquanto que à direita, na seção "Interações entre resíduos do epítopo com a proteína", são representadas as ligações químicas realizadas. Essas interações são indicadas por linhas tracejadas, onde cada cor corresponde a um tipo específico de ligação química. As esferas representam diferentes aminoácidos envolvidos nessas interações, e as cores associadas a cada tipo de ligação estão representados no final da figura.



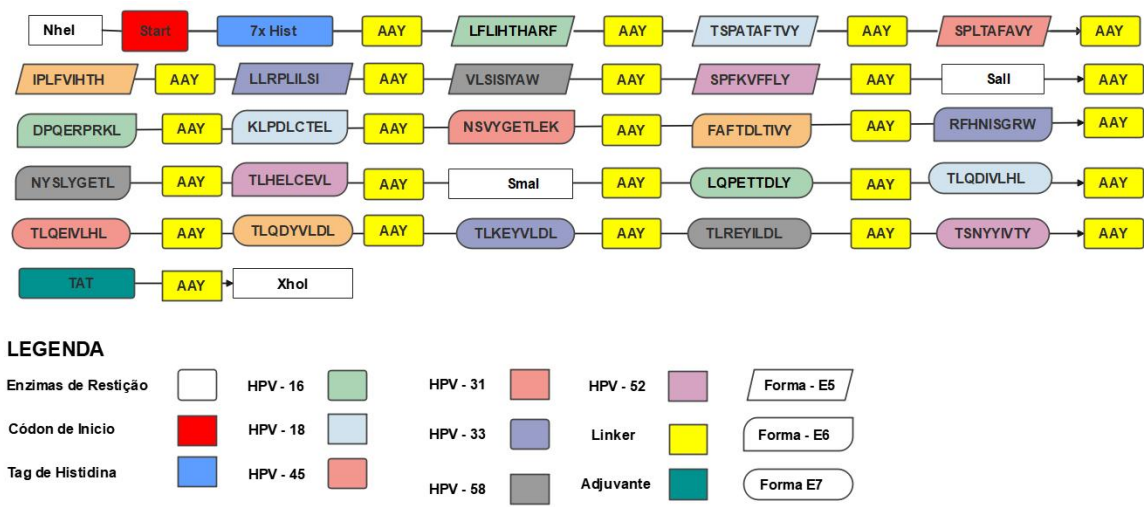
Fonte: *ChimeraX* modificado pelo autor (2025)

5.4 CONSTRUÇÃO DA SEQUENCIA DE PROTEÍNAS E NUCLEOTÍDEOS

Após o procedimento de *docking* e a confirmação do encaixe dos epítomos nas fendas dos HLA, bem como dos valores negativos de afinidade de ligação obtidos (exemplo: -X kcal/mol), a etapa seguinte foi a construção da sequência de aminoácidos. Para essa construção, utilizou-se o *linker* AAY entre os epítomos de células T. O *linker* AAY foi escolhido por sua flexibilidade e eficiência na clivagem, formando sítios adequados para o transporte dos epítomos via TAP, contribuindo para o aumento da apresentação antigênica e, conseqüentemente, para a ativação de linfócitos TCD8⁺ (Pandey et al., 2018). Com o objetivo de facilitar a purificação futura, garantir a estabilidade e permitir a detecção da construção multiepítomo, foi adicionada uma *tag* de histidina. Essa *tag* não só facilita a purificação por cromatografia de afinidade, mas também permite a detecção dos epítomos por métodos como Western blotting (Gurtler et al., 2011). Além disso, foi incorporado o adjuvante TAT (*Trans-Activator of Transcription*), uma proteína que desempenha a função de aumentar a eficácia de vacinas e terapias gênicas. O TAT facilita a entrada de moléculas nas células, melhorando a resposta imune (Vives; Brodin; Lebleu, 2004), conforme demonstrado em estudos anteriores.

Dessa forma, a construção foi realizada e os epítomos foram posicionados pela ordem das proteínas *Early*: primeiro os epítomos de E5, seguidos por E6 e E7. Enzimas de restrição foram adicionadas no início entre cada uma das proteínas *Early* e no final, com o propósito de permitir clivagem futura tanto da construção inteira quanto subdividida por tipo de proteína para testes subsequentes. A construção completa pode ser vista na figura 8, que ilustra claramente as interações entre os componentes. Essas etapas não apenas garantem uma construção robusta e funcional, mas também abrem caminho para futuras investigações sobre sua aplicação em vacinas e terapias imunológicas.

Figura 8 – Modelo Esquemático da Construção Multipéptopos. A imagem ilustra o início da sequência com a enzima de restrição "*NheI*", seguida por uma seta que indica a direção da continuidade da construção. Todas as adições realizadas na construção final estão representadas, incluindo as enzimas de restrição, o códon de início, a *tag* de histidina, os *linkers* e os epítopos com suas sequências e respectivos genótipos descritos na legenda. O tipo de proteína é indicado pelo formato de cada seção, o modelo apresenta o adjuvante utilizado e finaliza com a enzima de restrição "*XhoI*". A legenda no final proporciona uma identificação clara da localização e representação de cada elemento incorporado.



Fonte: Autoria Própria

A seleção das enzimas de restrição foi cuidadosamente planejada para se encaixar nos sítios do plasmídeo pVAX1. As sequências em aminoácidos e nucleotídeos da construção podem ser encontradas no Apêndice F. Este cuidado na escolha das enzimas é crucial, pois garante que as clivagens ocorram de forma precisa, permitindo a inserção adequada dos epítopos desejados e a manutenção da integridade do vetor.

Dentro dos epítopos selecionados para a construção, foram identificados três epítopos provenientes das proteínas E6 e E7 dos genótipos HPV-16 e HPV-18, cujos resultados experimentais estão disponíveis no banco de dados IEDB. Os epítopos selecionados – KLPDLCTEL (derivado da proteína E6 do HPV-18, ID: 32073), LQPETTDLY (proveniente da proteína E7 do HPV-16, ID: 911800) e TLQDIVLHL (derivado da proteína E7 do HPV-18, ID: 110440) – apresentaram afinidade

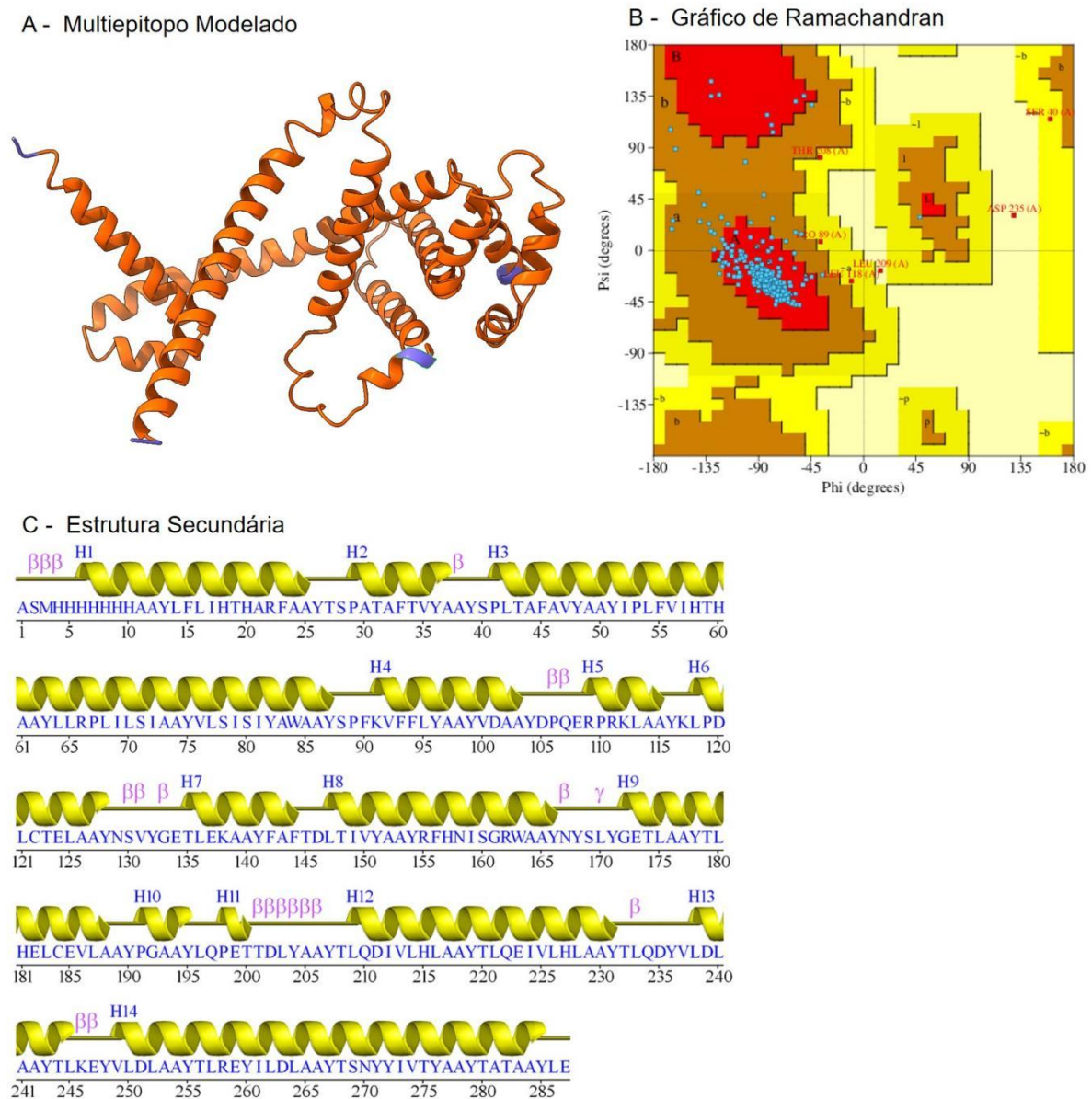
significativa com moléculas MHC, especialmente com os alelos HLA-A02:01. Além disso, todos os epítomos induziram liberação de IFN- γ e, em maior ou menor grau, ativam células T CD8⁺ em testes de citotoxicidade. Embora os resultados sejam promissores, a ativação celular variou para os epítomos LQPETTDLY e TLQDIVLHL, indicando a necessidade de abordagens experimentais alternativas para uma interpretação mais precisa. (Rudolf et al., 2001; Kristensen et al., 2024; Castellanos; Weinstein; Hayes, 2001).

Os resultados obtidos indicam que os epítomos selecionados apresentam grande potencial para induzir respostas imunes robustas. No entanto, é importante ressaltar que, embora outros epítomos não possuam testes documentados, a literatura disponível é mais extensa para os epítomos dos genótipos HPV-16 e HPV-18, o que se deve à maior quantidade de estudos focados nesses dois genótipos.

5.5 MODELAGEM DO MULTIEPÍTOMOS

A modelagem do Multiepítomos foi uma etapa essencial para simular a estabilidade, as prováveis interações e as cargas do antígeno. Como descrito na metodologia, a construção do Multiepítomos resultou em uma proteína modelada, que foi analisada por meio da ferramenta *PDBsum*. Foram realizados o gráfico de Ramachandran, a simulação da estrutura secundária e a análise do fator G (Figura 9). Os resultados obtidos indicam que a proteína modelada pelo *AlphaFold* apresentou uma conformação estável (Figura 9A), com uma combinação de hélices alfa (H1 a H14) e folhas beta (β), características fundamentais de proteínas com funções estruturais ou catalíticas (Figura 9C). Essa conformação é típica de proteínas estáveis devido às interações de hidrogênio que mantêm sua estrutura compacta. A disposição ordenada das hélices e folhas beta reforça o potencial da proteína para desempenhar funções como interação molecular ou atividade catalítica.

Figura 9 – Modelo da proteína multiepítipo e a qualidade do modelo avaliada pelo Gráfico de Ramachandran. A) Estrutura tridimensional do multiepítipo, evidenciando a organização espacial da proteína. B) Gráfico de Ramachandran mostrando a distribuição dos resíduos (pontos azuis), com regiões em vermelho indicando locais favoráveis para o posicionamento dos resíduos; um maior número de resíduos nessas áreas sugere melhor qualidade do modelo. C) Estrutura secundária da proteína, destacando folhas β e α -hélices, identificadas como H1, H2 e H3, que correspondem a regiões helicoidais com funções específicas: H1 na estabilidade estrutural, H2 em interações críticas e H3 na funcionalidade da proteína. A quantidade de folhas β indica a presença de estruturas secundárias formadas por cadeias polipeptídicas estabilizadas por ligações de hidrogênio entre os grupos amina e carbonila.



Fonte: autoria Própria

O gráfico de Ramachandran revelou que 88,9% dos resíduos estão localizados nas regiões mais favorecidas (A, B, L), o que é um forte indicativo de estabilidade estrutural. Outros 9,2% dos resíduos foram encontrados em regiões adicionais permitidas (a, b, l, p), o que é aceitável dentro dos padrões de modelagem. Apenas 0,7% dos resíduos estavam em regiões não permitidas (Gasteiger et al., 2005) sugerindo que as distorções presentes são mínimas e não comprometem significativamente a conformação geral da proteína (Figura 9C).

A análise do fator G também foi realizada para avaliar possíveis desvios estruturais. A média geral obtida foi de -1,12, indicando algumas distorções ou conformações fora do comum, especialmente nas interações covalentes da cadeia principal. Esses valores podem estar associados às regiões *linkers* AAY, conhecidas por sua maior flexibilidade estrutural. Embora esses desvios possam sugerir áreas menos estáveis, eles também podem refletir a adaptabilidade necessária para facilitar funções específicas.

De forma geral, a proteína construída apresenta uma boa distribuição das estruturas secundárias, com a maioria dos resíduos em conformações favoráveis. A organização compacta de hélices alfa e folhas beta reforça sua estabilidade estrutural e funcionalidade potencial. No entanto, os fatores G negativos e as pequenas distorções observadas no gráfico de Ramachandran indicam áreas que podem exigir ajustes para melhorar a estabilidade global da proteína. Para validar ainda mais sua funcionalidade e comportamento em condições variadas, recomenda-se realizar simulações de dinâmica molecular. Essas análises complementares poderão confirmar a viabilidade da construção como candidata para aplicações vacinais ou terapêuticas.

5.6 TESTES DE SEGURANÇA

Após a construção e modelagem da proteína, foram realizados testes adicionais para avaliar a toxicidade, antigenicidade e outras características físico-químicas essenciais para validar sua funcionalidade e segurança, cujos resultados estão sintetizados na tabela 6.

Tabela 6 – Testes de segurança e estabilidade da proteína multiepitopo. Os testes foram realizados após a modelagem final da proteína, utilizando a ferramenta *ProtParam* para analisar os valores de estabilidade e estrutura. Esta análise incluiu a avaliação de parâmetros como a composição de aminoácidos, a massa molecular, o índice de instabilidade, o ponto isoelétrico e as propriedades térmicas da proteína.

Propriedade/Teste	Valor	Interpretação/Significado	Referência
Número de Aminoácidos	287	A proteína tem uma estrutura relativamente grande e complexa. proteínas maiores tendem a ser mais estáveis devido ao número maior de interações internas.	Watson et al. 2017
Peso Molecular (kDa)	32,4 kDa	A proteína é de tamanho médio	Alberts et al., 2014)
pl (pH Isoelétrico)	5,77	A proteína é ligeiramente ácida, solúvel em condições levemente alcalinas.	Gasteiger et al., 2005
Meia-vida (<i>in vitro</i>, reticulócitos)	4,4 horas	A proteína tem uma degradação relativamente rápida em reticulócitos de mamíferos.	Gasteiger et al., 2005
Meia-vida (E. coli e Leveduras)	> 10 horas	A proteína tem boa estabilidade em sistemas bacterianos e de levedura.	(MAURIZI, 1992), Gasteiger et al., 2005
Índice de Instabilidade	35,30	A proteína é estável, com resistência à degradação em condições fisiológicas normais.	Gasteiger et al., 2005
Índice Alifático	105,37	Alta resistência térmica devido à contribuição de aminoácidos alifáticos à estabilidade da proteína.	Gasteiger et al., 2005
GRAVY (Hidropatia)	+0,368	Valor positivo indicando leve hidrofobicidade, favorecendo interações com membranas celulares.	Gasteiger et al., 2005
Toxicidade (<i>ToxinPred 2</i>)	ML score: 0,38; Hybrid score:0,38	Resultados indicam que a proteína é não tóxica	Sharma et al., 2022
Antigenicidade (<i>VaxiJen</i>)	0,5250	Indica uma probabilidade moderada de a proteína ser um antígeno protetor	Doytchinova; Flower, 2007
Alergenicidade (<i>Allertop</i>)	Não alergênica	A proteína é provavelmente não alergênica.	Dimitrov et al., 2014

Fonte: Autoria Própria

O teste de toxicidade realizado com a ferramenta *ToxinPred 2* gerou os seguintes resultados: *ML score*: 0,38 e *Hybrid score*: 0,38, sugerindo que a proteína é não tóxica, o que é crucial para garantir sua segurança em aplicações biológicas e terapêuticas (Sharma et al., 2022). Além disso, o teste de antigenicidade, conduzido com a ferramenta *VaxiJen*, obteve uma previsão geral de 0,5250, indicando uma probabilidade moderada de a proteína ser um antígeno protetor, considerando que o valor de corte típico para esse tipo de teste é 0,4 (Doytchinova; Flower, 2007). O teste de alergenidade, realizado pelo *Allertop*, indicou que a proteína provavelmente não é alergênica, fator relevante para evitar reações adversas em organismos hospedeiros (Dimitrov et al., 2014).

Utilizando a ferramenta *ProtParam*, foi possível determinar várias propriedades físico-químicas da proteína, fundamentais tanto para seu desempenho quanto para a hipótese de usos futuros. A construção é composta por 287 aminoácidos e apresenta uma estrutura relativamente grande e complexa, com um peso molecular de cerca de 32,4 kDa, o que a classifica como de tamanho médio. De acordo com Watson et al. (2017), proteínas de maior tamanho tendem a ser mais estáveis, devido ao maior número de interações internas que favorecem essa estabilidade, impactando positivamente o processo de *folding* da proteína. O *folding*, ou dobramento, refere-se ao processo pelo qual a proteína adquire sua estrutura tridimensional funcional. Embora proteínas maiores apresentem maior estabilidade, o processo de *folding* nelas é mais sensível a alterações estruturais e sequenciais. Assim, a proteína modelada, com seus 287 aminoácidos, apresenta boa estabilidade, mas com maior complexidade no processo de *folding*.

O *pI* (pH isoelétrico) da proteína foi calculado em 5,77, indicando que ela é ligeiramente ácida e solúvel em condições levemente alcalinas. A meia-vida da proteína, estimada em 4,4 horas em reticulócitos de mamíferos (*in vitro*), sugere uma degradação relativamente rápida nesse tipo celular. Contudo, em sistemas como *E. coli* e leveduras, a meia-vida foi estimada em mais de 10 horas, indicando boa estabilidade nessas condições (Gasteiger et al., 2005; Maurizi, 1992). O índice de instabilidade calculado foi de 35,30, abaixo de 40, o que indica que a proteína é estável e resistente à degradação em condições fisiológicas normais (Gasteiger et al., 2005). O índice alifático, que soma as contribuições dos aminoácidos alifáticos à

estabilidade térmica, obteve um valor elevado de 105,37, sugerindo alta resistência térmica. Por fim, o teste de GRAVY (*Grand Average of Hydropathicity*) gerou um valor de +0,368, indicando leve hidrofobicidade e favorecendo interações com membranas celulares (Gasteiger et al., 2005).

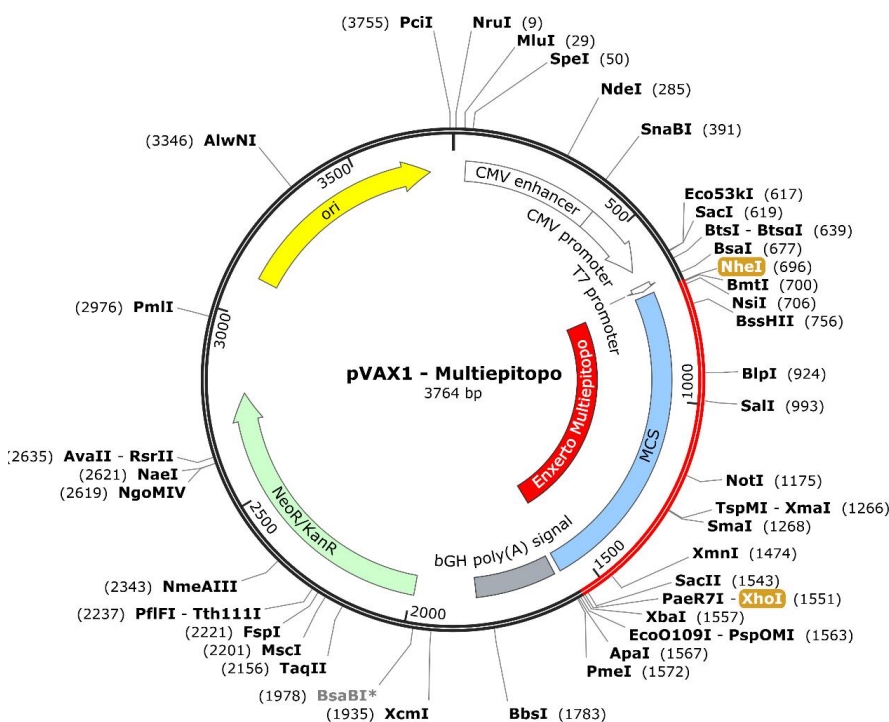
Em conclusão, a proteína modelada apresenta várias características que indicam sua estabilidade estrutural. Os resultados dos testes indicam uma proteína não tóxica e não alergenicidade, com bom potencial para induzir uma resposta imune. Quanto às propriedades físico-químicas, a proteína apresentou dados que indicam um bom equilíbrio de cargas, estabilidade, resistência a altas temperaturas e um bom tempo de meia-vida em sistemas bacterianos e de leveduras. Com base nesses dados, a proteína modelada mostra-se promissora para aplicações experimentais e uso com a finalidade de vacina terapêutica. No entanto, estudos adicionais, como testes de solubilidade, dinâmica molecular e validação funcional, são necessários para confirmar suas propriedades em condições experimentais.

5.7 CLONAGEM *IN SILICO*

Após a construção e modelagem do antígeno Multiepitópos, foi realizada a clonagem *in silico* do gene de interesse no vetor plasmídico pVAX1 (Invitrogen), para o desenvolvimento da vacina de DNA, a construção pode ser observado na figura 10. A clonagem *in silico* tem a finalidade de otimizar e verificar a viabilidade do processo de clonagem antes que ele seja realizado experimentalmente, e para isso foi selecionado o vetor pVAX1 devido à sua alta eficiência de expressão em células de mamíferos, este possui o promotor CMV, amplamente utilizado para garantir uma forte expressão em células eucarióticas. Para inserir a construção Multiepitópos no vetor, foram selecionados os locais de corte proporcionados pelas enzimas de restrição *NheI* e *XhoI*, enzimas amplamente utilizadas por sua especificidade e eficiência de corte, além de suas sequências de reconhecimento (*NheI*: 5'-GCTagC-3' e *XhoI*: 5'-CTCGAG-3') estarem localizadas em posições estratégicas no vetor pVAX1, facilitando a inserção da construção no vetor com precisão. O uso dessas enzimas garante que a inserção do antígeno Multiepitópos seja realizada de forma eficiente, minimizando o risco de mutações ou inserções indesejadas que poderiam comprometer a expressão do antígeno, a sequência nucleotídica completa do vetor

unido a proteína construída está disponível no apêndice F.

Figura 10 – Mapa da Construção do Plasmídeo pVAX1-Multiepitopo. O mapa representa a organização estrutural do plasmídeo pVAX1-Multiepitopo, desenvolvido *in silico* como vetor de expressão em células eucarióticas. O vetor contém elementos essenciais, como o promotor CMV (*Cytomegalovirus*), que direciona a expressão do transgene, e o realçador CMV, que potencializa a transcrição, o sinal de poliadenilação bGH (*bovine growth hormone*) assegura a estabilidade do RNA mensageiro, enquanto a origem de replicação (ori) permite a amplificação do plasmídeo em células bacterianas. O gene de resistência à canamicina (KanR) viabiliza a seleção de colônias transformadas. A sequência multiepitopo construída, em vermelho, está inserida na região MCS (*Multiple Cloning Site*), que contém diversos sítios de restrição para facilitar a clonagem. As enzimas *NheI* e *XhoI*, destacadas no mapa, são fundamentais pois são a região de corte da inserção da sequência de interesse. O mapa fornece uma visão detalhada da construção do vetor, auxiliando nas etapas de clonagem e expressão gênica.



Fonte: Snapgene modificado pelo autor (2025)

6 DISCUSSÃO

As vacinas multiepítipo contra o HPV têm se destacado na pesquisa científica devido à necessidade de abordagens mais eficazes para lidar com as questões terapêuticas relacionadas aos cânceres (De Groot et al., 2020). Vários projetos estão atualmente em andamento globalmente, todos visando a proteção contra cânceres associados ao HPV (Guo et al., 2024; Panahi et al., 2020; Pandey et al., 2018). O presente estudo busca inovar e superar limitações observadas em iniciativas anteriores, sendo essencial realizar comparações entre os projetos em andamento.

Entre os estudos existentes, três se destacam por apresentarem resultados e composições distintas, oferecendo reflexões sobre o desenvolvimento de vacinas. O trabalho de Pratiwi et al. (2024) propôs uma vacina multiepítipo terapêutica baseada nas oncoproteínas E6 e E7 dos tipos 16 e 18 do HPV, utilizando uma abordagem *in silico*. Os resultados apresentados quanto à predição e testes para triagens de epítomos, utilizaram ferramentas recentes que destacam a área emergente da imunoinformática, nesses resultados foi obtido altos valores tanto nos testes de estabilidades quanto nos testes de triagem para os epítomos, sendo assim a proteína formada apresenta uma boa estrutura. Contudo, a construção apresentada é significativamente diferente; a principal distinção reside no fato de o estudo se concentrar apenas nos epítomos dos HPVs 16 e 18, o que limita a cobertura para outros genótipos, apesar da importância desses tipos.

A construção da vacina de Pratiwi et al. utilizou diferentes *linkers*, como GP GPG e KK, além de incluir estímulos para células B e TCD4, o que auxilia no processo de apresentação humoral, mas também aumenta consideravelmente a proteína e o peso, sua construção final apresentou uma sequência maior (593 aminoácidos) e um peso molecular de 66,85 kDa, enquanto a construção do presente estudo resultou em uma proteína menor e mais leve, facilitando o transporte e a estabilidade. Um adjuvante também foi utilizado para aumentar o processo imunogênico; a escolha recaiu sobre a subunidade ribossomal 50S de *Escherichia coli*, outro ponto de dificuldade encontrados foi que os seus epítomos se ligaram a poucos alelos de HLA, com apenas alguns conseguindo se ligar a mais de dois, o que contrasta com os resultados encontrados neste estudo, onde a ligação foi mais

ampla. Contudo, as conclusões do projeto de Pratiwi et al. Assim como a minha, ainda são baseadas apenas em dados *in silico*, sendo necessários testes *in vitro* e em modelos animais para validação.

Um segundo estudo que se destaca é o de Panahi et al. (2018), que já apresentou resultados *in vitro* e *in vivo* (Panahi et al., 2020). Essa construção foi estruturada para HPV 16, 18, 31 e 45, utilizando as proteínas *Early* E5, E6 e E7, o que apresenta uma cobertura maior dos genótipos. Entretanto, a grande diferença apresentada foi no processo de triagem dos Epítomos e escolha das ferramentas de imunoinformática. Apesar do avanço da construção apresentada, ela encontrou problemas nos testes *in vitro* e *in vivo* devido às limitações das ferramentas disponíveis em 2018 e ao número reduzido de testes realizados para triagem. A expressão das três construções multiepítomos realizadas falhou em duas cepas bacterianas diferentes, mesmo sendo testadas em temperaturas distintas (30 e 37 °C) e concentrações de IPTG (0,2; 0,5; 1,0; e 2,0 mM). O autor discute que a provável causa é a falta do teste de GRAVY antes da construção; os valores apresentados para E5, E6 e E7 foram 1,730; 0,401; e 0,723 respectivamente, valores elevados como esses geram alta hidrofobicidade, o que pode ter causado a rejeição da expressão. O artigo menciona que, apesar dos resultados positivos — como aumento nos níveis de IFN- γ e granzima B e redução no tamanho dos tumores em camundongos — a pesquisa enfrentou desafios relacionados à necessidade de otimizar as formulações vacinais para maximizar a resposta imune. O estudo também trabalhou com abordagens utilizando diferentes adjuvantes e vetores para contornar problemas enfrentados relacionados à imunogenicidade.

O terceiro trabalho observado foi o de Guo et al. (2024), onde foi desenvolvido e avaliado quanto a imunogenicidade *in vivo*, foi realizado um design, com abordagens de imunoinformática, de múltiplos epítomos visando as proteínas E5, E6 e E7 do HPV16. Este trabalho também se manteve restrito ao HPV16 mesmo abordando mais proteínas. O projeto apresentou bons resultados nos testes da proteína completa com um Índice Alifático de 105,37, indicando excelente estabilidade térmica e um Ponto Isoelétrico (pI) de 5,77, indicando melhor solubilidade e redução da probabilidade de agregação. Contudo, os testes de triagem foram pouco explorados realizados apenas para a predição, conservação e cobertura, isso se mostrou problemático com a presença de epítomos classificados como

potenciais alérgenos (E6p5; E7p10; E7p11), limitando sua aplicabilidade. Mesmo assim, a vacina foi testada em um modelo de câncer cervical em camundongos C57BL/6 utilizando a linha celular TC-1 e obteve uma boa resposta imune com expressões adequadas de IFN- γ ; no entanto, problemas relacionados à imunogenicidade também foram identificados onde foi utilizada uma subunidade B da toxina da cólera (CTB) conjugada no N-terminal para funcionar como adjuvante molecular.

A compreensão da gama de trabalhos realizados com diferentes abordagens, e diferentes resultados pontua a complexidade do desenvolvimento de vacinas eficazes contra cânceres mediados por HPV. A constante atualização das ferramentas se mostra um grande aliado e diferencial para uma boa predição, evitando problemas futuros; e mesmo projetos em fases avançadas podem retornar ao início devido a erros que poderiam ser solucionáveis por meio de triagens mais efetivas. Além disso, a diversidade nas abordagens relacionadas às construções vacinais, incluindo diferença de escolha de genótipos, proteínas *linkers* e adjuvantes, reflete a necessidade urgente de contornar questões em comum, como à imunogenicidade e uma busca por uma ampla cobertura para os diferentes genótipos de HPVs de alto risco.

Um dos principais pontos frágeis em todas as abordagens é a questão da imunogenicidade que ainda precisa ser otimizada para garantir respostas imunes mais eficazes. Outro desafio comum é a dificuldade em traduzir os resultados promissores obtidos em simulações e modelos teóricos para aplicações práticas. Até o momento não existem vacinas clínicas terapêuticas amplamente aprovadas para o HPV, evidenciando assim a necessidade premente de superar barreiras críticas no desenvolvimento.

Dessa forma, a produção vacinal apresentada revela diferenciais promissores com abordagens distintas das apresentadas na literatura. O projeto inclui um processo robusto de predição com escolhas criteriosas dos epítomos passando por diversos testes, além de bons resultados apresentados nos testes estruturais do antígeno multiepítomo completo, como um ótimo Índice Alifático (105,37), que representa grande capacidade térmica, que se torna bem útil quando lembrado que vários países emergentes possuem vasto território e altas temperaturas. Também se trata de uma construção heptavalente, para E5, E6 e E7, voltada aos sete genótipos

mais vinculados ao câncer.

Desafios particulares também são vistos na construção, como tentar reduzir o valor GRAVY possivelmente separando regiões hidrofóbicas ou alterando a localização dos *linkers* para modular esse índice sem comprometer os epítomos imunogênicos.

Em síntese, desafios similares evidenciam que o avanço dessa área dependerá de esforços contínuos e colaborativos para superar limitações teóricas e práticas; estudos com diferentes abordagens são necessários para preencher as diversas lacunas existentes na pesquisa sobre vacinas contra o HPV. Sendo o atual trabalho um fortalecimento tanto para literatura, por evidências de uma construção com ótimo potencial futuro.

6 CONCLUSÃO

A análise dos aspectos do HPV abordados revela sua complexidade biológica e os desafios enfrentados por mulheres infectadas e pela saúde pública. Apesar dos avanços nas vacinas profiláticas, muitos países ainda lidam com a distribuição desigual da vacinação e o tratamento de cânceres já estabelecidos. As vacinas são essenciais, mas novas abordagens terapêuticas, como construções Multiepítomos utilizando ferramentas bioinformáticas para predição de epítomos e modelagem proteica, estão emergindo como intervenções inovadoras.

Este estudo propôs um modelo vacinal multiepítomo que abrange os sete principais genótipos oncogênicos do HPV, focando nas proteínas *Early* E5, E6 e E7. O objetivo foi desenvolver uma vacina contendo epítomos TCD8 + para promover um ataque celular específico às células cancerígenas. O processo incluiu rigorosas etapas de predição de epítomos imunogênicos, análise de conservação, testes de acoplamento molecular e modelagem estrutural.

Os resultados mostraram a eficiência da construção vacinal, com identificação de epítomos conservados e ampla cobertura populacional. Os testes indicaram bons valores de acoplamento molecular e diversidade genotípica. As análises estruturais confirmaram uma boa conformação proteica, ausência de toxicidade e propriedades antigênicas promissoras, destacando o potencial

terapêutico da proposta. Entretanto, desafios persistem, como a necessidade de reduzir a hidrofobicidade da proteína e otimizar a imunogenicidade. Por fim, a validação dos resultados por meio da síntese experimental da construção clonada *in silico* no vetor PVAX1 será crucial.

Desse modo, o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o HPV exige esforços colaborativos contínuos. Este trabalho contribui para a literatura científica ao apresentar uma construção inovadora com grande potencial terapêutico, oferecendo perspectivas promissoras para a saúde global e a qualidade de vida das mulheres.

REFERÊNCIAS

- ARBYN, M. et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. **The Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. 191-203, dez. 2019.
- CORDEIRO, M. N. et al. Anti-tumor effects of genetic vaccines against HPV major oncogenes. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 1, p. 45-52, 2015.
- FERRALL, L. et al. Cervical cancer immunotherapy: Facts and hopes. **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 10, 2021.
- HEGDE, N. R. et al. The use of databases, data mining and immunoinformatics in vaccinology: where are we? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, n. 1, 2018.
- KHIAVI, F. M. et al. Immunization of mice by a multimeric L2-based linear epitope (17-36) from HPV type 16/18 induced cross-reactive neutralizing antibodies. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 4, 2017.
- LIAO, S. et al. A novel "priming-boosting" strategy for immune interventions in cervical cancer. **Molecular Immunology**, v. 64, n. 2, 2015.
- MELIEF, C. J. M. et al. Strong Vaccine Responses During Chemotherapy are Associated With Prolonged Cancer Survival. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 535, 2020.
- MOLINA, M. A. et al. HPV integration and cervical cancer: a failed evolutionary viral trait. **Trends in Molecular Medicine**, v. 30, n. 9, p. 890-902, 2024.
- MO, Y. et al. Prophylactic and Therapeutic HPV Vaccines: Current Scenario and Perspectives. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022.
- MONK, B. J. et al. Integration of immunotherapy into treatment of cervical cancer: Recent data and ongoing trials. **Cancer Treatment Reviews**, v. 106, n. 102385, 2022.
- PANDEY, R. K. et al. Immunoinformatics approaches to design a novel multi-epitope subunit vaccine against HIV infection. **Vaccine**, v. 36, n. 6, 2018.
- PENG, S. et al. Development of DNA vaccine targeting E6 and E7 proteins of human papillomavirus 16 (HPV16) and HPV18 for immunotherapy in combination with recombinant vaccinia boost and PD-1 antibody. **MBio**, v. 12, n. 1, p. 10-1128, 2021.
- REYNISSON, B. et al. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: Improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 6, 2021.
- RODEN, R.; STERN, P. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, p. 240–254, 2018.
- VENUTI, A. et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 140, 2011.

PRUDDEN, H. J. et al. Understanding the public health value and defining preferred product characteristics for therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: World Health Organization consultations, October 2021—March 2022. **Vaccine**, v. 40, n. 41, p. 5843-5855, 2022.

DORJI, Thinley et al. Human papillomavirus vaccination uptake in low-and middle-income countries: a meta-analysis. **eClinicalMedicine**, v. 34, n. 100836, 17 abr. 2021.

BHATLA, Neerja; SINGHAL, Seema. Primary HPV screening for cervical cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 65, p. 98-108, maio 2020.

GARDINI, M. Abordagens de controle e tratamento para o câncer cervical: em que ponto estamos? Monografia (Bacharelado em Biomedicina) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2022. p. 18-21.

SZYMONOWICZ, Klaudia Anna; CHEN, Junjie. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. **Cancer Biology & Medicine**, [S.l.], v. 17, n. 4, p. 864–878, dez. 2020.

WHO. Cervical cancer. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>. Acesso em: 19 dez. 2024.

OYERVIDES-MUÑOZ, Mariel Araceli et al. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. **Infection, Genetics and Evolution**, [S.l.], v. 61, p. 134-144, jul. 2018.

BHAT, Dharitri. The ‘Why and How’ of Cervical Cancers and Genital HPV Infection. **Cytojournal**, v. 19, p. 22, mar. 2022.

MOLINA, Mariano A.; STEENBERGEN, Renske D.M.; PUMPE, Anna; KENYON, Angelique N.; MELCHERS, Willem J.G. HPV integration and cervical cancer: a failed evolutionary viral trait. **Review**, v. 30, n. 9, p. 890-902, setembro 2024.

HANCOCK, Gemma; HELLNER, Karin; DORRELL, Lucy. Therapeutic HPV vaccines. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 59-72, fevereiro 2018.

SMALL JR., William et al. Cervical cancer: A global health crisis. **Cancer**, v. 123, n. 13, p. 2404-2412, 1 jul. 2017.

MALAGÓN, T.; FRANCO, E. L.; TEJADA, R.; et al. Epidemiology of HPV-associated cancers past, present and future: towards prevention and elimination. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 21, p. 522–538, 2024.

BALASUBRAMANIAM, S. D. et al. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. **Medicina (Kaunas)**, v. 55, n. 7, p. 384, 2019. DOI: 10.3390/medicina55070384.

BHATTACHARJEE, Rahul et al. Mechanistic role of HPV-associated *Early* proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 174, n. 103675, jun. 2022.

SANJOSE, S. de et al. The natural history of human papillomavirus infection. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 2-13, fev. 2018.

SUPRYNOWICZ, F.; DISBROW, G.; KRAWCZYK, E.; SIMIC, V.; LANTZKY, K.; SCHLEGEL, R. HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. **Oncogene**, v. 27, n. 8, p. 1071-1078, 2008.

KABSCH, K.; ALONSO, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL-and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. **Journal of Virology**, v. 76, n. 23, p. 12162-12172, 2002.

MŁYNARCZYK-BONIKOWSKA, Beata; RUDNICKA, Lidia. HPV Infections—Classification, Pathogenesis, and Potential New Therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 14, p. 7616, 11 jul. 2024. DOI: 10.3390/ijms25147616.

SAILER, C.; OFFENSPERGER, F.; JULIER, A.; et al. Structural dynamics of the E6AP/UBE3A-E6-p53 enzyme-substrate complex. **Nature Communications**, v. 9, n. 4441, 25 out. 2018.

YOUSEFI, Zahra; ARIA, Hamid; GHAEDEHRAHMATI, Farhoodeh; et al. An update on human papilloma virus vaccines: history, types, protection, and efficacy. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 805695, 27 jan. 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2021.805695. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.805695>. Acesso em: 12 jan. 2025.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. GLOBOCAN 2020: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. **Global Cancer Observatory**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

BASUKALA, O.; BANKS, L. The Not-So-Good, the Bad and the Ugly: HPV E5, E6 and E7 Oncoproteins in the Orchestration of Carcinogenesis. **Viruses**, v. 13, n. 1892, p. 1-15, 2021.

PERRI, Francesco; LONGO, Francesco; CAPONIGRO, Francesco; et al. Management of HPV-Related Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Pitfalls and Caveat. **Cancers (Basel)**, Basel, v. 12, n. 4, p. 975, abr. 2020. doi: 10.3390/cancers12040975.

MOODY, C.; LAIMINS, L. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 550–560, ago. 2010. doi: 10.1038/nrc2886.

SMALLEY RUMFIELD, C. et al. HPV Vaccines as a Potential Therapeutic Strategy for Cervical Cancer. **Infectious Therapy and Translation**, v. 2020, p. 167-200, 7 out. 2020. doi: 10.2147/ITT.S273327. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/ITT.S273327>. Acesso em: 14 jan. 2025.

MYLNARCZYK-BONIKOWSKA, B.; RUDNICKA, L. HPV Infections-Classification, Pathogenesis, and Potential New Therapies. **International Journal of Molecular**

Sciences, v. 25, n. 14, p. 7616, 11 jul. 2024. doi: 10.3390/ijms25147616. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25147616>. Acesso em: 14 jan. 2025.

KECHAGIAS, K. S. et al. Role of human papillomavirus (HPV) vaccination on HPV infection and recurrence of HPV related disease after local surgical treatment: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, 2022, v. 378.

ILLAH, O.; OLAITAN, A. Updates on HPV Vaccination. **Diagnostics (Basel)**, v. 13, n. 2, p. 243, 9 jan. 2023.

GONÇALVES, C. A. et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of therapeutic vaccines for patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3) associated with human papillomavirus: a systematic review. **Cancers (Basel)**, v. 16, n. 3, p. 672, 5 fev. 2024.

SHEETS, E.E. et al. Immunotherapy of human cervical high-grade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, p. 916–926, 2003.

GARCIA, F. et al. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: A randomized controlled trial. **Obstet. Gynecol.**, p. 317–326, 2004.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, E. et al. Regression of papilloma high-grade lesions (CIN 2 and CIN 3) is stimulated by therapeutic vaccination with MVA E2 recombinant vaccine. **Cancer Gene Ther.**, p. 592, 2006.

KAUFMANN, A.M. et al. Vaccination trial with HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3). **Int. J. Cancer**, p. 2794–2800, 2007.

ROMAN, L.D. et al. A phase II study of Hsp-7 (SGN-00101) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecol. Oncol.**, p. 558–566, 2007.

TRIMBLE, C.L. et al. A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3. **Clin. Cancer Res.**, p. 361–367, 2009.

BRUN, J. et al. Regression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia with TG4001 targeted immunotherapy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, p. e1–e169, 2011.

SOLARES, A.M. et al. Safety and immunogenicity of a human papillomavirus peptide vaccine (CIGB-228) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia: First-in-human, proof-of-concept trial. **ISRN Obstet. Gynecol.**, p. 292951, 2011.

VAN STEENWIJK, P.J.V. et al. A placebo-controlled randomized HPV16 synthetic long-peptide vaccination study in women with high-grade cervical squamous intraepithelial lesions. **Cancer Immunol. Immunother.**, p. 1485–1492, 2012.

KAWANA, K. et al. Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. **Vaccine**, p. 6233–6239, 2014.

KIM, T.J. et al. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. **Nat. Commun.**, p. 5317, 2014.

GREENFIELD, W.W. et al. A phase I dose-escalation clinical trial of a peptide-based human papillomavirus therapeutic vaccine with Candida skin test reagent as a novel vaccine adjuvant for treating women with biopsy-proven cervical intraepithelial neoplasia 2/3. **Oncoimmunology**, p. e1031439, 2015.

TRIMBLE, C.L. et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. **Lancet**, p. 2078–2088, 2015.

ALVAREZ, R.D. et al. A pilot study of pNGVL4a-CRT/E7 (detox) for the treatment of patients with HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3 (CIN2/3). **Gynecol. Oncol.**, p. 245–252, 2016.

COLEMAN, H.N. et al. Human papillomavirus type 16 viral load is decreased following a therapeutic vaccination. **Cancer Immunol. Immunother.**, p. 563–573, 2016.

CHOI, Y.J. et al. A Phase II, Prospective, Randomized, Multicenter, Open-Label Study of GX-188E, an HPV DNA Vaccine, in Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia 3. **Clin. Cancer Res.**, p. 1616–1623, 2020.

AFROUGH, B.; DOWALL, S.; HEWSON, R. Emerging viruses and current strategies for vaccine intervention. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 196, n. 2, p. 157–166, 2019

BAHRAMI, A. A.; PAYANDEH, Z.; KHALILI, S.; ZAKERI, A.; BANDEHPOUR, M. Imunoinformática: abordagens *in silico* e design computacional de uma proteína imunogênica multiepítipo. **International Reviews of Immunology**, v. 38, n. 6, p. 307–322, 2019

HUNG, C. F.; WU, T. C.; MONIE, A.; RODEN, R. Antigen-specific immunotherapy of cervical and ovarian cancer. **Immunological Reviews**, v. 222, p. 43–69, 2008
KARDANI, Kimia; BOLHASSANI, Azam; NAMVAR, Ali. An overview of *in silico* vaccine design against different pathogens and cancer. **Expert Review of Vaccines**, v. 19, n. 7, p. 699–726, 2020

KIM, T. J. et al. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. **Nature Communications**, v. 5, p. 5317, 2014

LUNDSTROM, K. Self-replicating RNA viruses for RNA therapeutics. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3310, 2018

NEMATİ, A. S. et al. Desenvolvimento de uma nova vacina de DNA multiepítipo contra o coronavírus SARS-CoV-2 humano: um estudo de design imunoinformático. **Turkish Journal of Biology**, v. 46, n. 4, p. 263–276, 2022

RAHMA, O. E. et al. Pre-immature dendritic cells (PIDC) pulsed with HPV16 E6 or E7 peptide are capable of eliciting specific immune response in patients with advanced cervical cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 353, 2014

BUI, H. H.; SIDNEY, J.; DINH, K.; SOUTHWOOD, S.; NEWMAN, M. J.; SETTE, A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 17, p. 153, 2006.

REZA ADITAMA, Rizarullah; ARIFIN GIRI-RACHMAN, Ernawati; HERTADI, Rukman. Designing a Novel Multipeptide Vaccine from the Human Papilloma Virus E1 and E2 Proteins for Indonesia with Immunoinformatics and Molecular Dynamics Approaches. **ACS Omega**, v. 9, n. 14, p. 12456–12468, 2024

SCHOEN, C.; LOEFFLER, D. I.; FRENTZEN, A.; PILGRIM, S.; GOEBEL, W.; STRITZKER, J. *Listeria monocytogenes* as novel carrier system for the development of live vaccines. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p. 45–58, 2008

STEINMAN, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 1–22, 2012

VICI, P. et al. Targeting immune response with therapeutic vaccines in premalignant lesions and cervical cancer: hope or reality from clinical studies. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 10, p. 1327–1336, 2016

WANG, Renjie; PAN, Wei; JIN, Lei et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. **Cancer Letters**, v. 471, p. 88–102, 28 fev. 2020

ZHU, L. et al. Design and evaluation of a multi-epitope DNA vaccine against HPV16. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 20, n. 1, p. 2352908, 2024

YAO, Y. et al. HPV-16 E6 and E7 protein T cell epitopes prediction analysis based on distributions of HLA-A loci across populations: an *in silico* approach. **Vaccine**, v. 31, n. 3, 2013

GREENBAUM, J. et al. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. **Immunogenetics**, v. 63, n. 11, 2011

WEISKOPF, D. et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, 2012

CALIS, J. J. A. et al. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. **PloS Computational Biology**, v. 9, n. 3, 2013

- GUPTA, R. et al. *in silico* Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013
- DHANDA, S. K. et al. Development of a novel *clustering* tool for linear peptide sequences. **Immunology**, v. 155, p. 331-345, 2018
- BUI, H. H. et al. Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, 2007
- DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by *docking* with PyRx. **Methods in Molecular Biology**, v. 1263, 2015
- BERMAN, H. M. et al. The *Protein Data Bank*. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000
- CHEN, X.; ZARO, J. L.; SHEN, W. C. Fusion protein *linkers*: Property, design and functionality. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 1357-1369, 2013
- LIVINGSTON, B. et al. A Rational Strategy to Design Multiepitope Immunogens Based on Multiple Th Lymphocyte Epitopes. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 11, p. 5499–5506, 2002
- PANDEY, R. K. et al. Immunoinformatics approaches to design a novel multi-epitope subunit vaccine against HIV infection. **Vaccine**, v. 36, n. 6, 2018
- DONG, R. et al. Contriving Multi-Epitope Subunit of Vaccine for COVID-19: Immunoinformatics Approaches. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020
- DAVIS, M. W.; JORGENSEN, E. M. ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. **Frontiers in Bioinformatics**, v. 2, p. 846860, 2022.
- LINDNER, H. A.; KRAUS, M.; HILDEBRAND, A.; RICHTER, K. A. Histidine-tagged proteins: A versatile tool for purification and characterization. **Methods in Molecular Biology**, v. 425, p. 123-134, 2008.
- FRANKEL, A. D.; PABO, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. **Cell**, v.55, p.1189-1193, 1988.
- JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with *AlphaFold*. **Nature**, v.596, p.583–589, 2021.
- PANDEY, R.K.; MISHRA, V.; ASTHANA, S.; DIXIT, A.; SARAVANAN KUMAR K.; **Immunoinformatics** approaches to design a novel multi-epitope subunit vaccine against HIV infection.
- PETTERSEN, E.F.; GODDARD T.D.; HUANG C.C.; *ChimeraX*: Visualization and analysis of molecular structures.

PDBsum Generate - EMBL-EBI. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>. Acesso em: 18 jan. 2025.

SnapGene. SnapGene: Software for everyday molecular biology. Disponível em: <https://www.snapgene.com/>. Acesso em: 18 jan. 2025.

VITALE, M. et al. The Immune Epitope Database and Analysis Resource in vaccine design: a review. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 278, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00278.

JENSEN, K. K. et al. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. W1, p. W449–W454, 2020.

FERREIRA, Guilherme N. M.; MONTEIRO, Gabriel A.; PRAZERES, Duarte M. F.; CABRAL, Joaquim M. S. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, n. 9, p. 380-388, 2000.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. *AutoDock Vina*: Improving the speed and accuracy of *docking* with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

GURTLE, H. et al. His-tag: A powerful tool for the purification of recombinant proteins. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 4, p. 537-545, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.04.001.

VIVES, E.; BRODIN, P.; LEBLEU, B. The TAT protein of HIV-1: A review of its properties and applications in gene therapy. **Current Gene Therapy**, v. 4, n. 3, p. 265-276, 2004.

RUDOLF, M. P. et al. Human T-cell responses to HLA-A-restricted high binding affinity peptides of human papillomavirus type 18 proteins E6 and E7. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 3 Suppl, p. 788s-795s, Mar. 2001.

KRISTENSEN, N. P.; DIONISIO, E.; BENTZEN, A. K.; TAMHANE, T.; KEMMING, J. S.; NOS, G.; VOSS, L. F.; HANSEN, U. K.; LAUER, G. M.; HADRUP, S. R. Simultaneous analysis of pMHC binding and reactivity unveils virus-specific CD8 T cell immunity to a concise epitope set. **Sci Adv.**, v. 10, n. 15, p. eadm8951, 2024. DOI: 10.1126/sciadv.adm8951.

CASTELLANOS, M. R.; WEINSTEIN, G.; HAYES, R. L. A rapid method to identify cytotoxic T-lymphocyte peptide epitopes from HLA-A2 (+) donors. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v. 39, n. 1-2, p. 133-138, 2001. DOI: 10.1016/s1040-8428(01)00112-3.

SHARMA, N.; NAOREM, L. D.; JAIN, S.; RAGHAVA, G. P. S. *ToxinPred2*: an improved method for predicting toxicity of proteins. **Brief Bioinform.**, 2022.

DOYTCHINOVA, Irini A.; FLOWER, Darren R. *VaxiJen*: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 4, 2007.

DIMITROV, I.; BANGOV, I.; FLOWER, D. R.; DOYTCHINOVA, I. *Allertop v.2* - a server for *in silico* prediction of allergens. **Journal of Molecular Modeling**, v. 20, p. 2278, 2014.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the *ExPASy* Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa: Humana Press, 2005.

WATSON, M. D.; MONROE, J.; RALEIGH, D. P. Size-dependent relationships between protein stability and thermal unfolding temperature have important implications for analysis of protein energetics and high-throughput assays of protein–ligand interactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 122, n. 21, p. 5278–5285, 2017.

ALBERTS, Bruce et al. **Molecular Biology of the Cell**. 6th ed. New York: Garland Science, 2014.

MAURIZI, M. R. Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. **Experientia**, v. 48, n. 2, p. 178-201, 15 fev. 1992.

PRATIWI, Sari Eka; YSRAFIL, Ysrafil; MARDHIA, Mardhia; et al. A novel therapeutic multiepitope vaccine based on oncoprotein E6 and E7 of HPV 16 and 18: An *in silico* approach. **Bioimpacts**, v. 14, n. 5, p. 27846, 2024. doi:

PANAHI, P.; BOLHASSANI, A.; JAVADI, M.; NOORMOHAMMADI, A.; AGI, E. Development of multiepitope vaccines against the most prevalent high-risk human papillomaviruses. **Research Article**, 2020.
(PANAHI et al., 2020) - ARTIGO DOS TESTES.

PANAHI, Heidar Ali; BOLHASSANI, Azam; JAVADI, Gholamreza; NOORMOHAMMADI, Zahra. A comprehensive *in silico* analysis for identification of therapeutic epitopes in HPV16, 18, 31 and 45 oncoproteins. **PLoS One**, [s.l.], v. 13, n. 10, p. e0205933, 24 out. 2018.
(PANAHI et al., 2018) - Artigo da predição.

GUO, Ni; NIU, Zhixin; YAN, Zhiling; et al. Immunoinformatics design and *in vivo* immunogenicity evaluation of a conserved CTL multi-epitope vaccine targeting HPV16 E5, E6, and E7 proteins. **Vaccines**, Kunming, v. 12, n. 4, p. 392, 2024.

APENDICES

APÊNDICE A

Lista de todos os Epítomos que obtiveram no mínimo 2 Epítomos com conservação mínima de 70% de identidade

Genótipo	E5	E6	E7
HPV-16	LFLIHTHARF	KISEYRHYCY, LQPETTDLY, IPLFLIHTH, FAFRDL CIVY, LLMGTLGIV	VYIPLFLIH, HNIRGRWTGR, CLLIRPLLL, KQRFHNIRGR, LIILVLLLW, EVYDFAFRDL, IVYRDGNPY, DPQERPRKL, CYSLYGTTL
HPV-18	TSPATAFTVY, YAWVLV FVY	LQDIEITCVY, RRFHNIAGHY, DSVYGDTLEK, GLYNLLIRC, MARFEDPTRR, EVFEFAFKDL, AFKDLFVVYR, DSIPHAACHK, VVYRDSIPHA, LEKLTNTGLY, LQRRRETQV, NEKRRFHNI, KL PDLCTEL	TLQDIVLHL, YSRIREL RHY, FQQLFLNTL, RAEPQRHTM
HPV-45	SPLTAFAVY, QSVYVCAFAW	YSRIEL RYY, KATLERTEVY, NSVYGETLEK, LEKITNTELY, RTEVYQFAFK, LYNLLIRCL, AFKDL CIVYR, LNPAEKRRHL, RQERLRRRR, IVYRDCIAY, VYQFAFKDL, KL PDLCTEL, RRFHSIAGQY, LQDVSIACVY KVSEFRWYRY, FAFTDLTIVY, YSVYGT TLEK, KNPAERPRKL, HNIGGRWTGR, RFHNIGGRW, EVL DFAFTDL, LEIPYDELRL, IVYRDDTPY	TLQEIVLHL, HGPRET LQEI, SSAEDLRTL, VLHLEPQNEL
HPV-31	IPLFVIHTH, CLVIRPLVL	DFAFADLT VV, LETTIHNIEL, KISEYRH YNY, EVYDFAFADL, NISGRWAGR, RFHNISGRW, VVYREGNPF, KKRHVDLNK, NYSVYGNTL, KLCLRFLSK, MFQDTEEKPR	TSNYNIVTF, QPEATDLHCY, LLMGSGFIV, TLQDYVLDL, RGETPTLQDY
HPV-33	STYAWLLVLV, VFVLCFILF, LLRPLILSI, SPLKIFFCY, KIFFCYLLF, LLVLVLLLW	FVFADLRIVY, VYRDGNPFA, KISEYRH YNY, EVYDFVFADL, NISGRWTGR, SLYGETLEQT, AVCWRPRRR, RFHNISGRW, RSEVYDFVF, KKRHVDLNK, NYSLYGETL	AQPATADYY, LYPEPTDLY, TLKEYVLDL, LLMGTVNIV, HTCNTTVRL
HPV-58	SIYAWLLVL, MMCINFHAQY, SALRIFFCY, IFVVCFILF, RIFFCYLIF, VLSISYAW, VSVG SALRIF, LLVLVLLLW	KFLFTDLRIV, KKELRREVVY, EESVHEIRL, EDPATRPRTL, ATRPRTLHEL, KISEYRHYQY, NIMGRWTGR, TLHELCEVL, RIVYRDNNPY, SEITIRCII, RFHNIMGRW, SVHEIRLQCV, CPEEKERHV, IMCLRFLSK	HPEPTDLFCY, AQPATANYY, STATEVRTL, TLREYILD
HPV-52	AQVLVLVLL, KVFFLYLLF, SPFKVFFLY		TSNYYIVTY, QPETTDLHCY, STATDLRTL

Fonte: Autoria Própria

APÊNDICE B

Cobertura Populacional entre Epítoss pós conservação

Genótipo	Proteína	Epítopo	HLAs	cobertura %
HPV-16	E5	LFLIHTHARF	HLA-A23:01, HLA-A24:02	26,18
	E5	IPLFLIHTH	HLA-B35:01, HLA-B53:01	10,84
	E6	DPQERPRKL	HLA-B08:01, HLA-B51:01, HLA-B*07:02	29,13
	E6	CYSLYGTTL	HLA-A23:01, HLA-A24:02	26,18
	E7	LQPETTDLY	HLA-B15:01, HLA-A30:02, HLA-A*01:01	26,34
	E7	LLMGTLGIV	HLA-A*02:03	0,97
HPV-18	E5	TSPATAFTVY	HLA-B35:01, HLA-A01:01, HLA-B*53:01	26,30
	E5	YAWVLVFVY	HLA-B35:01, HLA-B53:01	10,84
	E6	KLPDLCTEL	HLA-A02:01, HLA-A02:03, HLA-A*02:06	41,35
	E6	GLYNLLIRC	HLA-A*02:01	39,08
	E7	TLQDIVLHL	HLA-A02:01, HLA-A02:06, HLA-A02:03, HLA-A32:01, HLA-A*68:02	46,72
	E7	RAEPQRHTM	HLA-B*07:02	12,78
HPV-45	E5	SPLTAFVY	HLA-B35:01, HLA-B53:01	10,84
	E5	QSVYVCAFAW	HLA-B57:01, HLA-B58:01	7,26
	E6	KLPDLCTEL	HLA-A02:01, HLA-A02:03, HLA-A*02:06	41,35
	E6	NSVYGETLEK	HLA-A11:01, HLA-A03:01, HLA-A*68:01	35,75
	E7	TLQEIVLHL	HLA-A02:01, HLA-A02:03, HLA-A02:06, HLA-A32:01, HLA-B*08:01	50,68
	E7	VLHLEPQNEL	HLA-A02:01, HLA-A02:03	19,71
HPV-31	E5	IPLFVIHTH	HLA-B35:01, HLA-B53:01	10,84
	E5	CLVIRPLVL	HLA-B*08:01	10,55
	E6	FAFTDLTIVY	HLA-B35:01, HLA-A26:01, HLA-B53:01, HLA-B15:01, HLA-A*01:01	37,17
	E6	YSVYGTLEK	HLA-A03:01, HLA-A11:01, HLA-A*68:01	35,75
	E7	TLQDYVLDL	HLA-A02:01, HLA-A02:06, HLA-A*02:03	41,35
	E7	RGETPTLQDY	HLA-B44:03, HLA-B44:02, HLA-A30:02, HLA-A01:01	30,51
HPV-33	E5	LLRPLILSI	HLA-A02:03, HLA-B08:01, HLA-A32:01, HLA-A02:01	49,37
	E5	SPLKIFFCY	HLA-B35:01, HLA-B53:01	10,84
	E6	RFHNISGRW	HLA-A23:01, HLA-A24:02, HLA-A*32:01	30,13
	E6	NYSVYGNTL	HLA-A24:02, HLA-A23:01	26,18
	E7	TLKEYVLDL	HLA-B08:01, HLA-A02:03, HLA-A*02:01	46,19
	E7	LLMGTVNIV	HLA-A02:01, HLA-A02:06	40,60
HPV-58	E5	VLSISYAW	HLA-A32:01, HLA-B58:01, HLA-B57:01, HLA-B53:01	13,86
	E5	MMCINFHAQY	HLA-B*15:01	8,44
	E6	RFHNISGRW	HLA-A23:01, HLA-A24:02, HLA-A*32:01	30,13
	E6	NYSLYGETL	HLA-A24:02, HLA-A23:01	26,18
	E7	TLREYILD	HLA-B08:01, HLA-A02:03, HLA-A*02:01	46,19
	E7	HPEPTDLFCY	HLA-B35:01, HLA-B53:01, HLA-A*01:01	26,30
HPV-52	E5	SPFKVFFLY	HLA-B35:01, HLA-B53:01, HLA-A26:01, HLA-A30:02	18,130
	E5	KVFFLYLLF	HLA-A*23:01	5,43
	E6	TLHELCEVL	HLA-A*02:01	39,08
	E6	RFHNIMGRW	HLA-A23:01, HLA-A24:02, HLA-A*32:01	30,13
	E7	TSNYYIVTY	HLA-A30:02, HLA-A01:01, HLA-A26:01, HLA-B35:01, HLA-B15:01, HLA-B58:01, HLA-A32:01, HLA-B57:01	45,21
	E7	QPETDLHCY	HLA-B44:03, HLA-B44:02, HLA-B35:01, HLA-B53:01	23,68

Fonte: Autoria Própria

APÊNDICE C

Epítomos finais selecionados e seus valores representativos obtidos

Tipo de HPV	Proteína	Epítopo	Percentile Ranking	HLAs Ligantes	Cobertura%	Conservação	Imunogenicidade	Afinidade de Ligação
HPV - 16	E5	LFLIHTHARF	0,27	HLA-A*23:01, HLA-A*24:02	26,18	16.67% (2/12)	0,29333	-9,5
	E6	DPQERPRKL	0,05	HLA-B*08:01, HLA-B*51:01, HLA-B*07:02	29,13	26.67% (4/15)	0,02079	-9,1
	E7	LQPETTDLY	0,14	HLA-B*15:01, HLA-A*30:02, HLA-A*01:01	26,34	33.33% (5/15)	0,18373	-8,8
HPV - 18	E5	TSPATAFTVY	0,41	HLA-B*35:01, HLA-A*01:01, HLA-B*53:01	26,3	16.67% (2/12)	0,27875	-9,6
	E6	KLPDLCTEL	0,1	HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06	41,35	40.00% (6/15)	0,04843	-8,8
	E7	TLQDIVLHL	0,01	HLA-A*02:01, HLA-A*02:06, HLA-A*02:03, HLA-A*32:01, HLA-A*68:02	46,72	46.67% (7/15)	0,16272	-8,1
HPV - 45	E5	SPLTAFVY	0,02	HLA-B*35:01, HLA-B*53:01	10,84	16.67% (2/12)	0,2409	-8,5
	E6	NSVYGETLEK	0,18	HLA-A*11:01, HLA-A*03:01, HLA-A*68:01	35,75	80.00% (12/15)	0,22586	-8,6
	E7	TLQEIVLHL	0,02	HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*32:01, HLA-B*08:01	50,68	26.67% (4/15)	0,24115	-8,3
HPV - 31	E5	IPLFVIHTH	0,16	HLA-B*35:01, HLA-B*53:01	10,84	16.67% (2/12)	0,32966	-9,8
	E6	FAFTDLTIVY	0,04	HLA-B*35:01, HLA-A*26:01, HLA-B*53:01, HLA-B*15:01, HLA-A*01:01	37,17	86.67% (13/15)	0,26084	-10
	E7	TLQDYVLDL	0,09	HLA-A*02:01, HLA-A*02:06, HLA-A*02:03	41,35	46.67% (7/15)	0,02358	-8,4
HPV - 33	E5	LLRPLILSI	0,37	HLA-A*02:03, HLA-B*08:01, HLA-A*32:01, HLA-A*02:01	49,37	25.00% (3/12)	0,0141	-9,2
	E6	RFHNISGRW	0,23	HLA-A*23:01, HLA-A*24:02, HLA-A*32:01	30,13	53.33% (8/15)	0,0367	-10,4
	E7	TLKEYVLDL	0,09	HLA-B*08:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:01, HLA-A*32:01, HLA-B*58:01, HLA-B*57:01, HLA-B*53:01	46,19	40.00% (6/15)	0,06961	-8,5
HPV - 58	E5	VLSISYAW	0,05	HLA-B*58:01, HLA-B*57:01, HLA-B*53:01	13,86	16.67% (2/12)	0,06414	-10,6
	E6	NYSLYGETL	0,14	HLA-A*24:02, HLA-A*23:01	26,18	33.33% (5/15)	0,07062	-9,2
	E7	TLREYILD	0,18	HLA-B*08:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:01	46,19	20.00% (3/15)	0,24283	-9,2
HPV - 52	E5	SPFKVFFLY	0,03	HLA-B*35:01, HLA-B*53:01, HLA-A*26:01, HLA-A*30:02	18,13	16.67% (2/12)	0,06372	-10,6
	E6	TLHELCEVL	0,43	HLA-A*02:01	39,08	20.00% (3/15)	0,15832	-7,8
	E7	TSNYIVTY	0,05	HLA-A*30:02, HLA-A*01:01, HLA-A*26:01, HLA-B*35:01, HLA-B*15:01, HLA-B*58:01, HLA-A*32:01, HLA-B*57:01	45,21	26.67% (4/15)	0,11539	-10,1

Fonte: Autoria Própria

APÊNDICE D

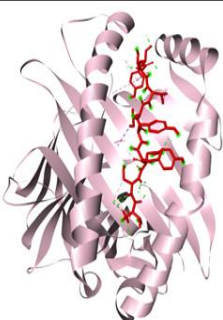
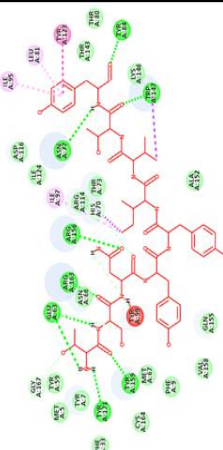
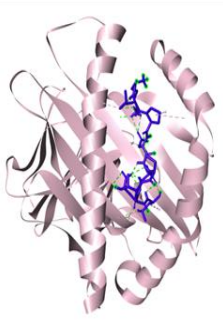
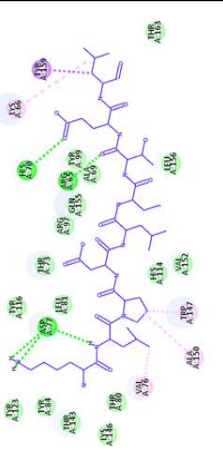
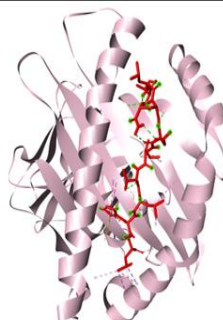
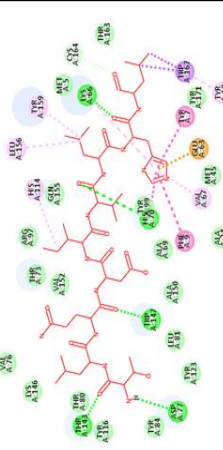
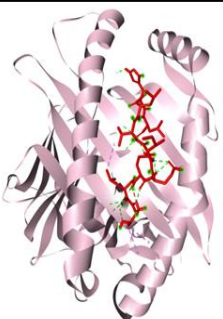
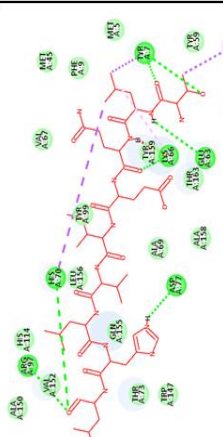
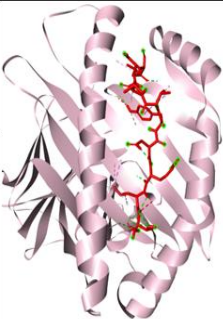
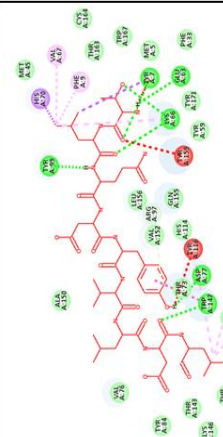
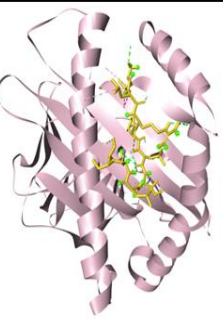
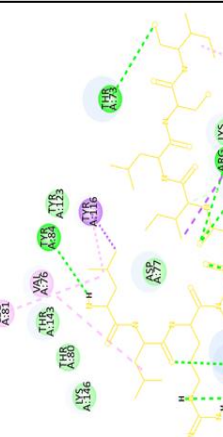
Tabela com valor de afinidade de ligação com a fenda de HLA. Os valores são respectivos com a ordem dos HLAs

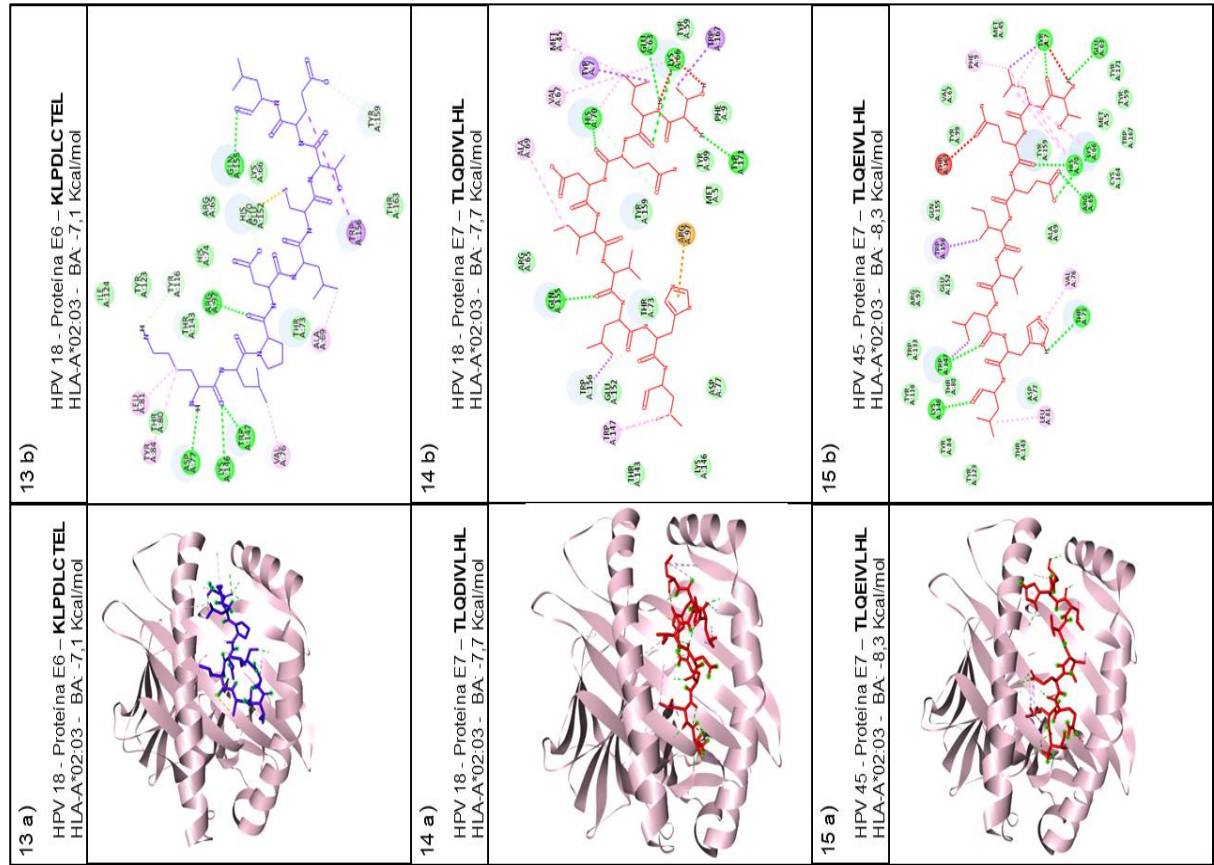
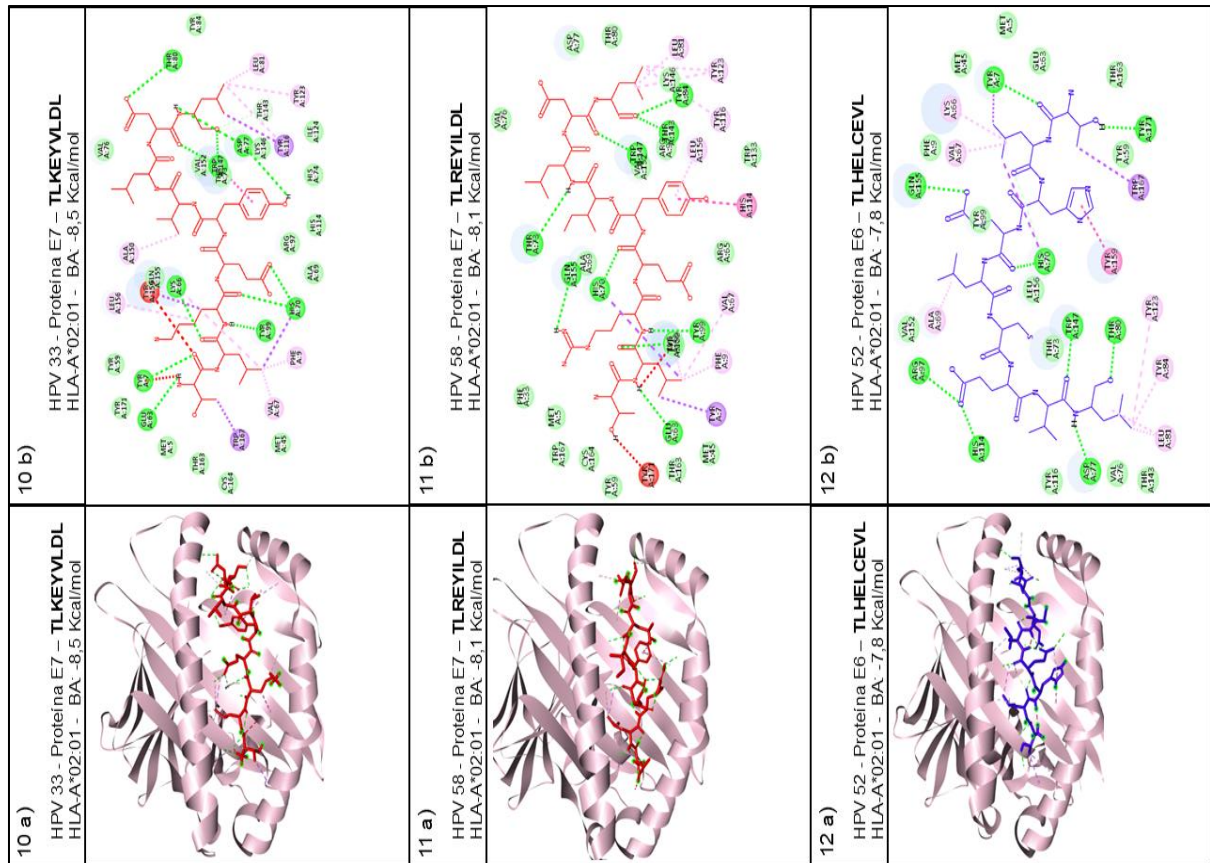
Tipo de HPV	Proteína	Epítipo	HLAs	Afinidade de Ligação
HPV 16	E5	LFLIHTHARF	HLAA 2402	-9,5
	E6	DPQERPRKL	HLAB 0702, HLAB 0801, HLAB 5101	-8,9, -9,1, -8,8
	E7	LQPETTDLY	HLAA 0101, HLAB 1501	-8,8, -8,7
HPV 18	E5	TSPATAFTVY	HLAA 0101, HLAB 3501, HLAB 5301	-9,1, -9,6, -8,6
	E6	KLPDLCTEL	HLAA 0203, HLAA 0206, HLAA 0201	-7,1, -8,8, -6,3
	E7	TLQDIVLHL	HLAA 0203, HLAA 0206, HLAA 0201	-7,7, -8,1, -8
HPV 31	E5	IPLFVIHHTH	HLAB 3501, HLAB 5301	-9,8, -7,4
			HLAA 0101, HLAB 1501, HLAB 3501,	
	E6	FAFTDLTIVY	HLAB 5301	-9,3, -9,8, -10, -8,5
HPV 33	E7	TLQDYVLDL	HLAA 0203, HLAA 0206, HLAA 0201	-7,2, -8,1, -8,4
	E5	LLRPLILSI	HLAB 0801, HLAA 0203, HLAA 0201	-9,2, -7,8, -7,4
	E6	RFHNISGRW	HLAA 2402	-10,4
HPV 45	E7	TLKEYVLDL	HLAB 0801, HLAA 0203, HLAA 0201	-7,6, -8,1, -8,5
	E5	SPLTAFVY	HLAB 3501, HLAB 5301	-8,5, -8,6
	E6	NSVYGETLEK	HLAA 0301, HLAA 1101, HLAA 6801	-8,4, -7,8, -8,6
HPV 52			HLAB 0801, HLAA 0203, HLAA 0206,	
	E7	TLQEIVLHL	HLAA 0201	-8,3, -8,3, -7,5, -7,3
	E5	SPFKVFFLY	HLAB 3501, HLAB 5301	-10,6, -9,6
HPV 58	E6	TLHELCEVL	HLAA 0201	-7,8
			HLAA 0101, HLAB 1501, HLAB 3501,	
	E7	TSNYYIVTY	HLAA 6801, HLAB 5801	-9,4, -7,8, -8,8, -8,7, -10,1
HPV 58	E5	VLSISYAW	HLAB 5301, HLAB 5701, HLAB 5801	-8,9, -10,6, -8,6
	E6	NYSLYGETL	HLAA 2402	-9,2
	E7	TLREYILD	HLAB 0801, HLAA 0203, HLAA 0201	-9,2, -7,7, -8,1

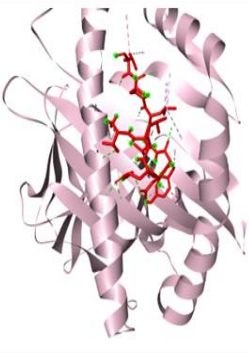
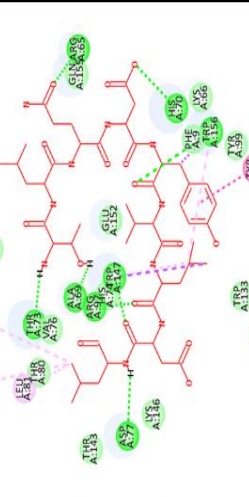
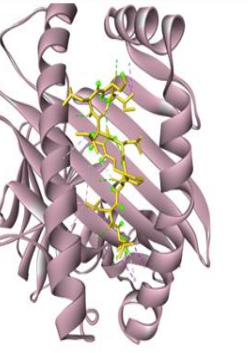
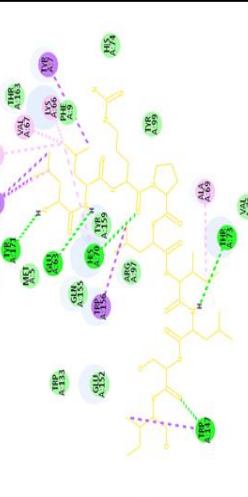
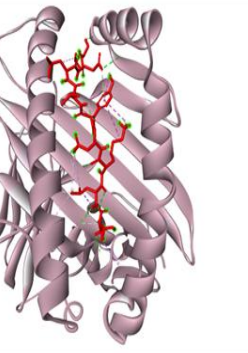
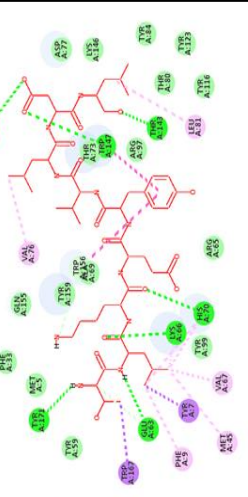
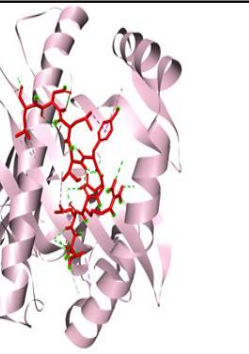
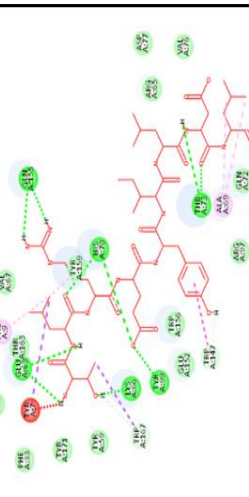
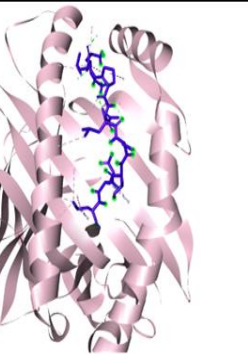
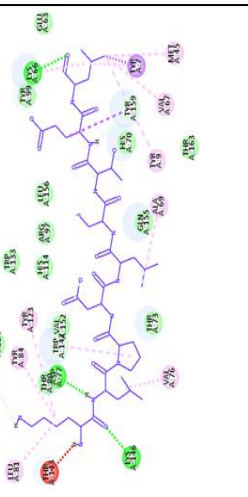
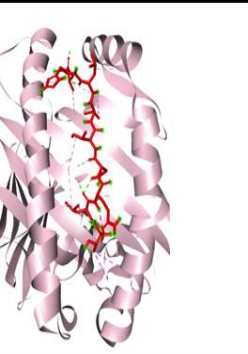
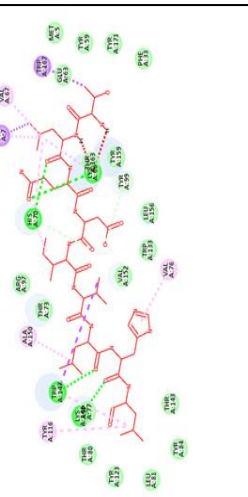
Fonte: Autoria Própria

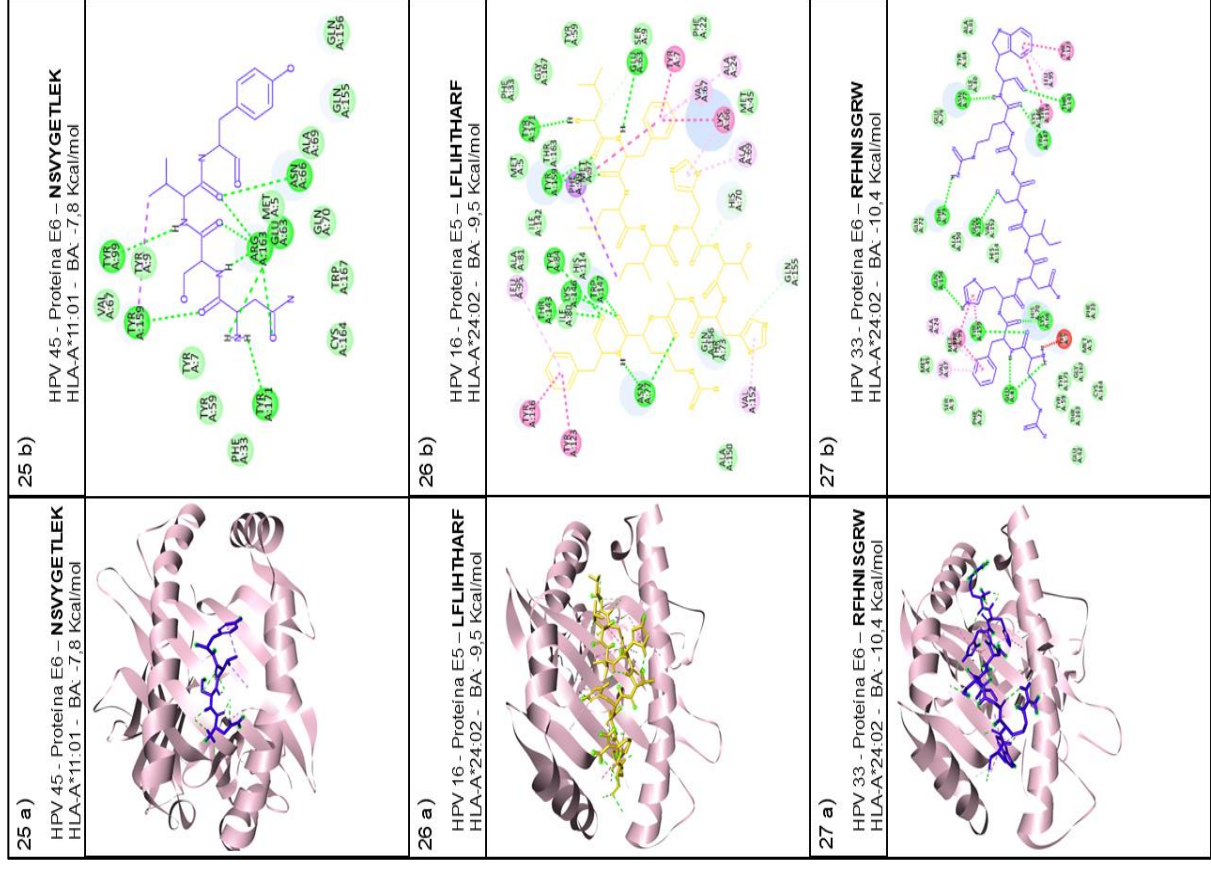
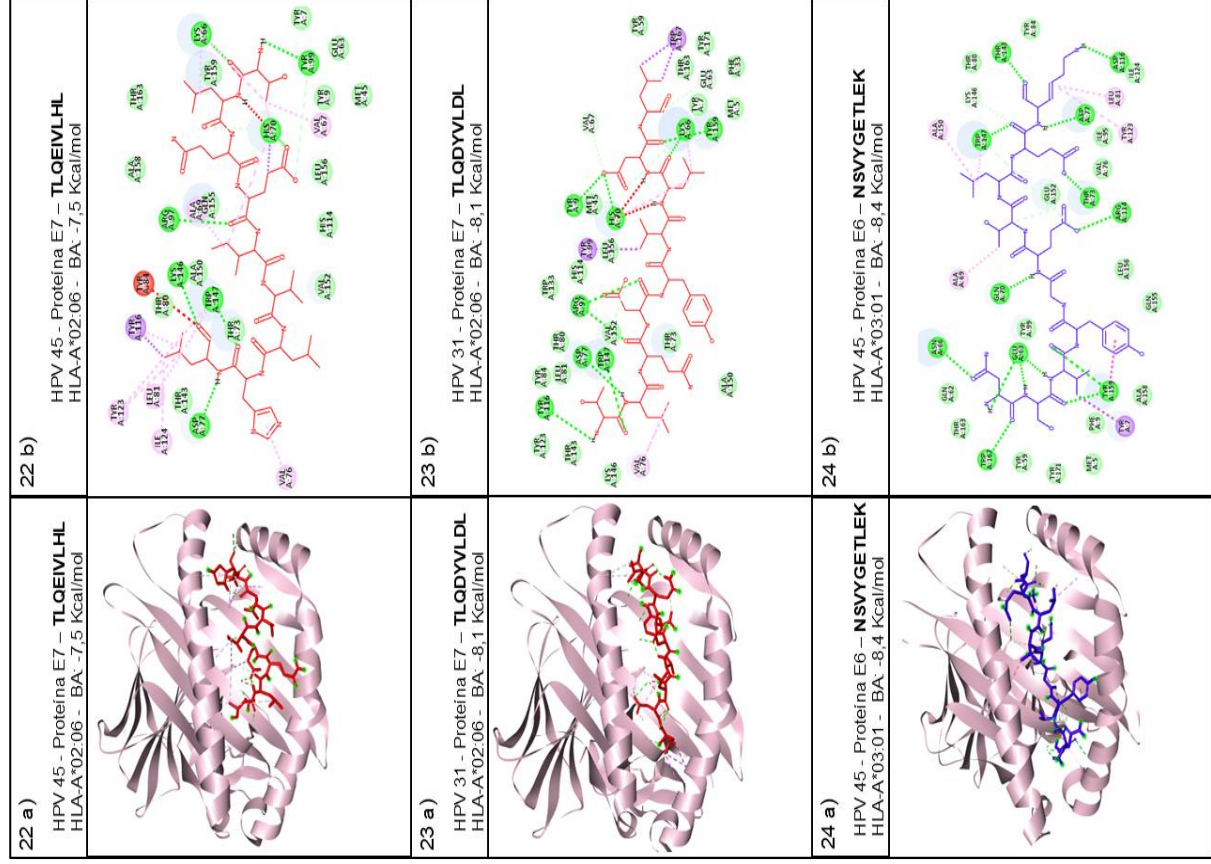
APÊNDICE E

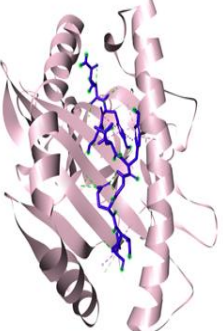
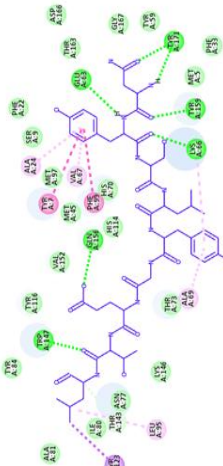
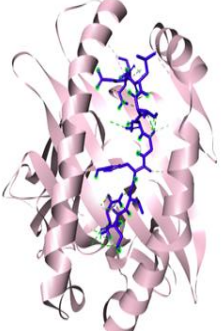
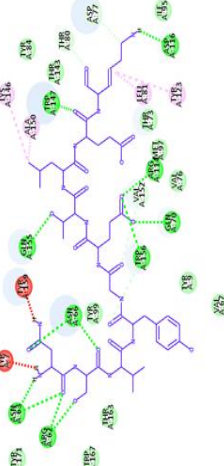
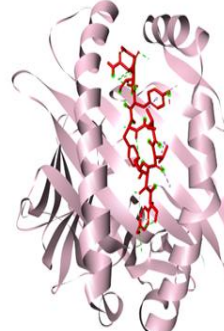
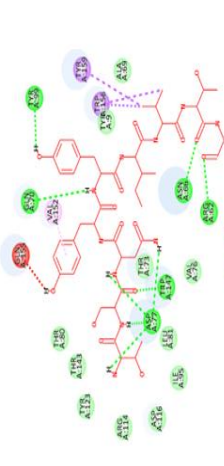
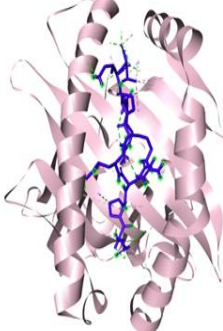
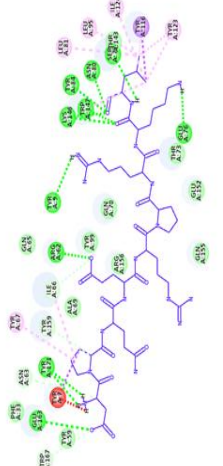
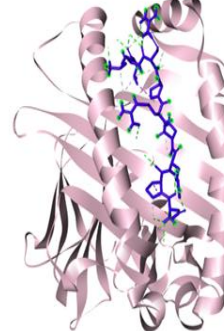
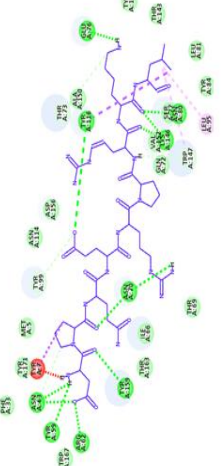
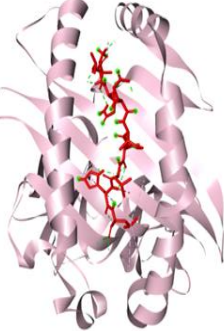
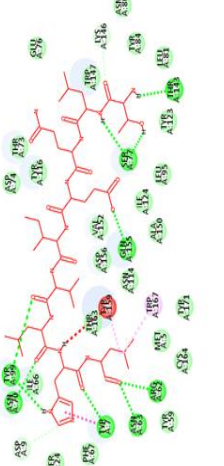
Epítomos na fenda do HLA e predições de suas ligações químicas

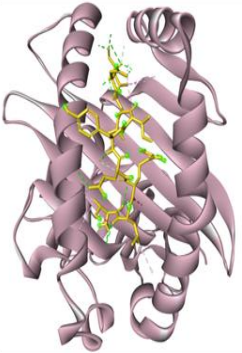
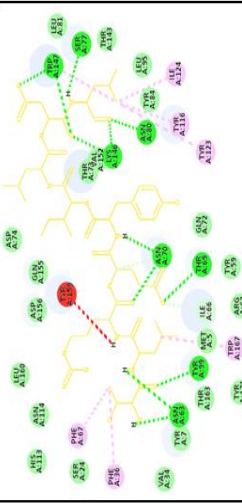
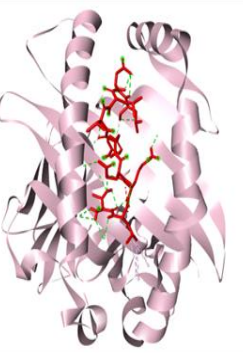
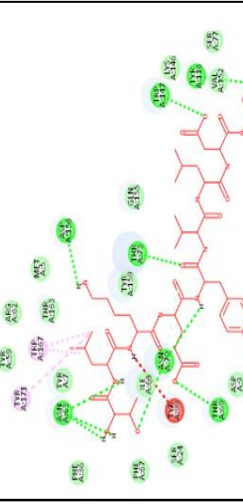
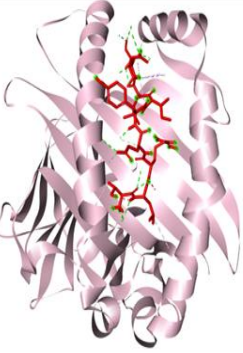
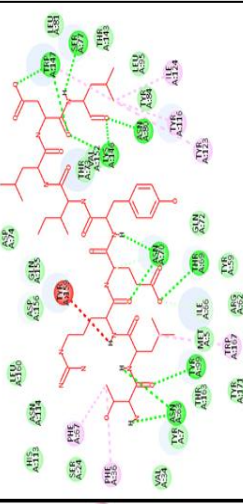
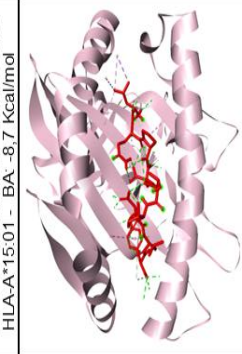
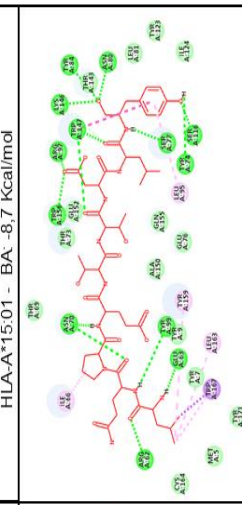
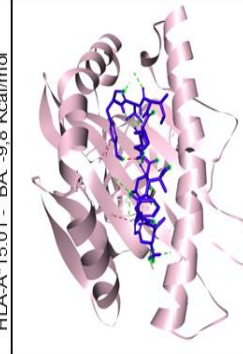
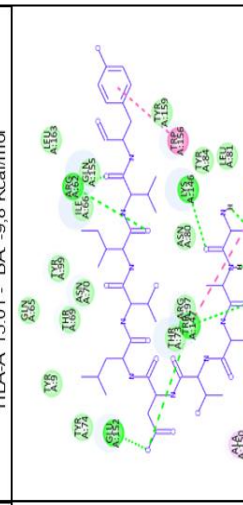
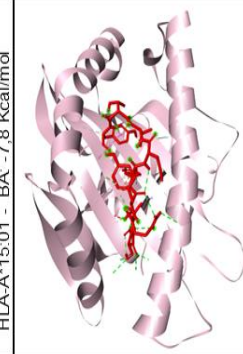
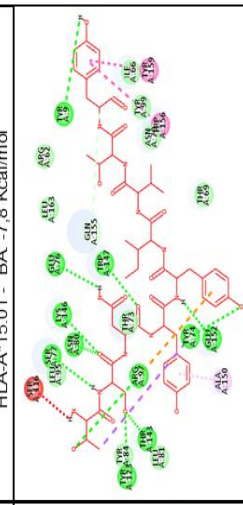
4 a) HPV 52 - Proteína E7 – TSNYYIVTY HLA-A*01:01 - BA -9,4 Kcal/mol 	4 b) HPV 52 - Proteína E7 – TSNYYIVTY HLA-A*01:01 - BA -9,4 Kcal/mol 
5 a) HPV 18 - Proteína E6 – KLPDLCTEL HLA-A*02:01 - BA -6,3 Kcal/mol 	5 b) HPV 18 - Proteína E6 – KLPDLCTEL HLA-A*02:01 - BA -6,3 Kcal/mol 
6 a) HPV 18 - Proteína E7 – TLQDIVLHL HLA-A*02:01 - BA -8 Kcal/mol 	6 b) HPV 18 - Proteína E7 – TLQDIVLHL HLA-A*02:01 - BA -8 Kcal/mol 
7 a) HPV 45 - Proteína E7 – TLQEVILHL HLA-A*02:01 - BA -7,3 Kcal/mol 	7 b) HPV 45 - Proteína E7 – TLQEVILHL HLA-A*02:01 - BA -7,3 Kcal/mol 
8 a) HPV 31 - Proteína E7 – TLQDYVLDL HLA-A*02:01 - BA -8,4 Kcal/mol 	8 b) HPV 31 - Proteína E7 – TLQDYVLDL HLA-A*02:01 - BA -8,4 Kcal/mol 
9 a) HPV 33 - Proteína E5 – LLRPILLSI HLA-A*02:01 - BA -7,4 Kcal/mol 	9 b) HPV 33 - Proteína E5 – LLRPILLSI HLA-A*02:01 - BA -7,4 Kcal/mol 

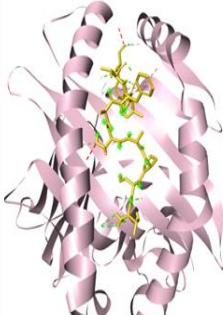
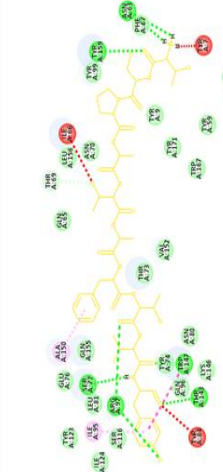
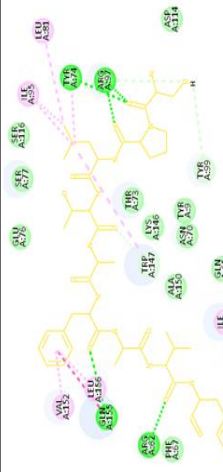
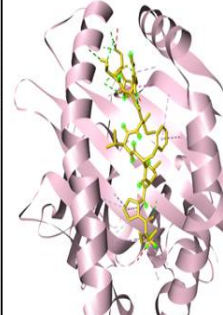
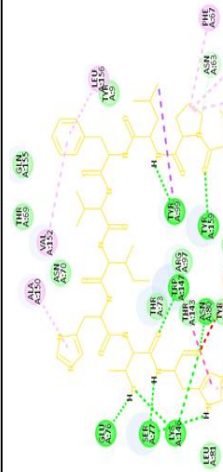
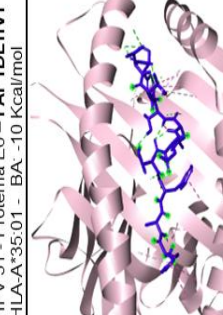
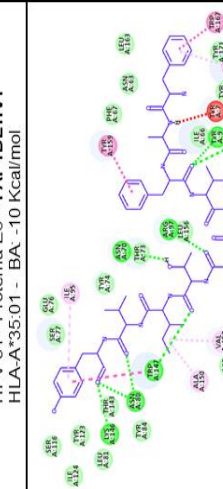
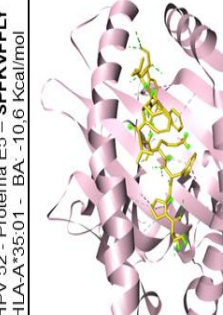
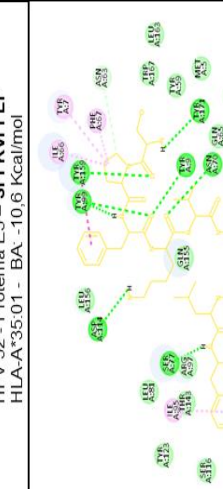
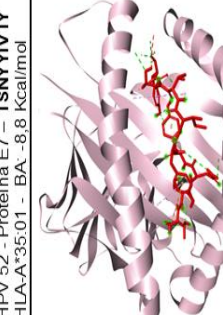
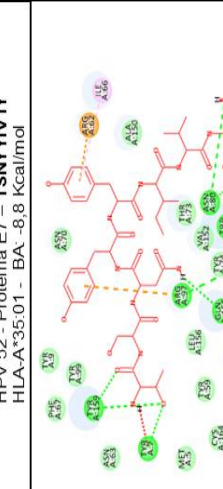


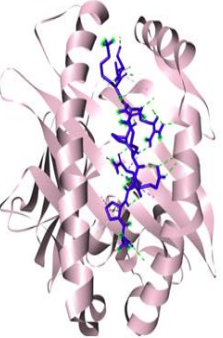
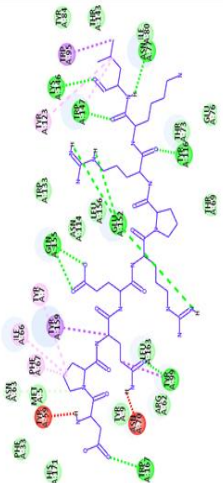
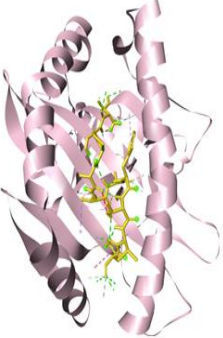
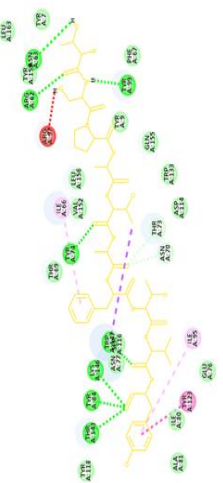
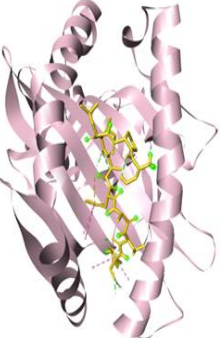
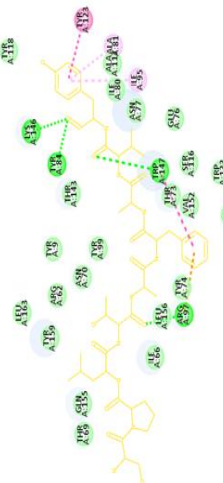
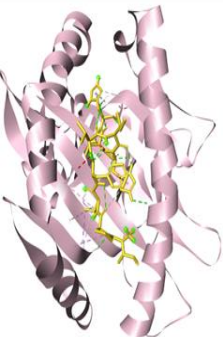
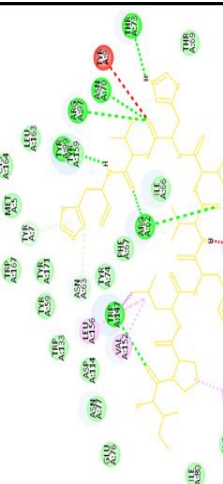
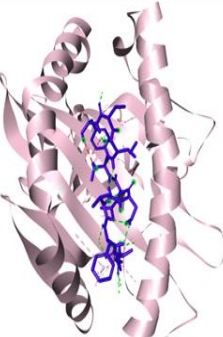
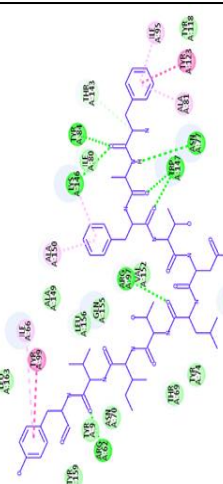
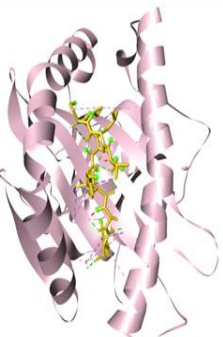
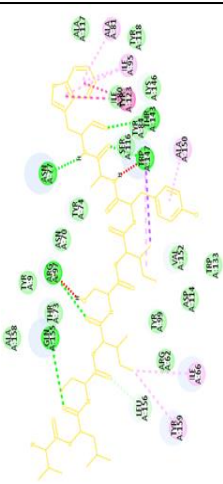
16 a) HPV 31 - Proteína E7 – TLQDYVLDL HLA-A*02:03 - BA: -7,2 Kcal/mol		16 b) HPV 31 - Proteína E7 – TLQDYVLDL HLA-A*02:03 - BA: -7,2 Kcal/mol	
17 a) HPV 33 - Proteína E5 – LLRPLILSI HLA-A*02:03 - BA: -7,8 Kcal/mol		17 b) HPV 33 - Proteína E5 – LLRPLILSI HLA-A*02:03 - BA: -7,8 Kcal/mol	
18 a) HPV 33 - Proteína E7 – TLKEYVLDL HLA-A*02:03 - BA: - Kcal/mol		18 b) HPV 33 - Proteína E7 – TLKEYVLDL HLA-A*02:03 - BA: - Kcal/mol	
19 a) HPV 58 - Proteína E7 – TLREYILD HLA-A*02:03 - BA: -7,7 Kcal/mol		19 b) HPV 58 - Proteína E7 – TLREYILD HLA-A*02:03 - BA: -7,7 Kcal/mol	
20 a) HPV 18 - Proteína E6 – KLPDLCTEL HLA-A*02:06 - BA: -7,6 Kcal/mol		20 b) HPV 18 - Proteína E6 – KLPDLCTEL HLA-A*02:06 - BA: -7,6 Kcal/mol	
21 a) HPV 18 - Proteína E7 – TLQDIVLHL HLA-A*02:06 - BA: -8,1Kcal/mol		21 b) HPV 18 - Proteína E7 – TLQDIVLHL HLA-A*02:06 - BA: -8,1Kcal/mol	

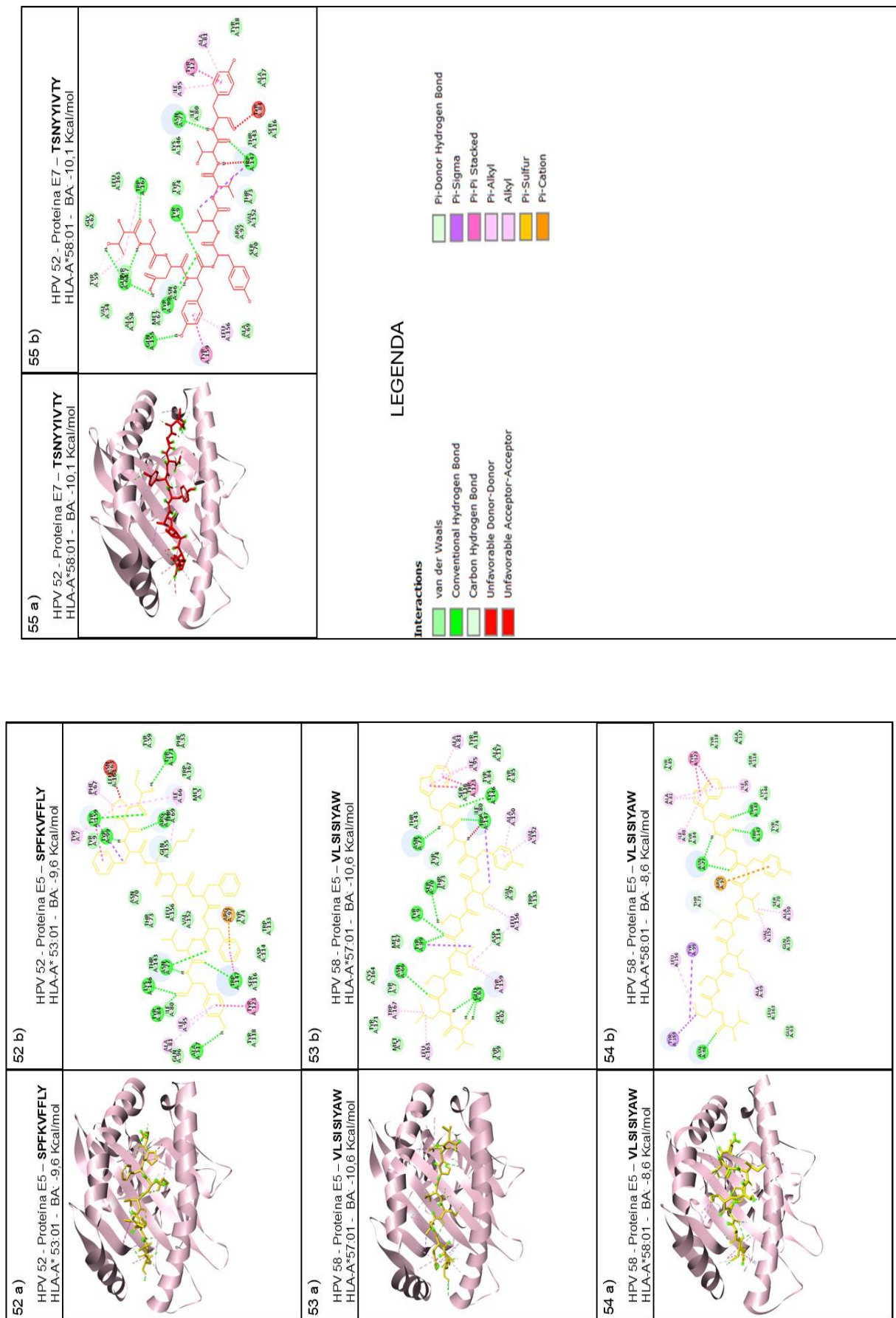


28 a) HPV 58 - Proteína E6 – NYSLYGETL HLA-A*24:02 - BA: -9,2 Kcal/mol 	28 b) HPV 58 - Proteína E6 – NYSLYGETL HLA-A*24:02 - BA: -9,2 Kcal/mol 
29 a) HPV 45 - Proteína E6 – NSVYGETLEK HLA-A*68:01 - BA: -8,6 Kcal/mol 	29 b) HPV 45 - Proteína E6 – NSVYGETLEK HLA-A*68:01 - BA: -8,6 Kcal/mol 
30 a) HPV 52 - Proteína E7 – TSNYIVTY HLA-A*68:01 - BA: -8,7 Kcal/mol 	30 b) HPV 52 - Proteína E7 – TSNYIVTY HLA-A*68:01 - BA: -8,7 Kcal/mol 
31 a) HPV 16 - Proteína E6 – DPQERPRKL HLA-A*07:02 - BA: -8,9 Kcal/mol 	31 b) HPV 16 - Proteína E6 – DPQERPRKL HLA-A*07:02 - BA: -8,9 Kcal/mol 
32 a) HPV 16 - Proteína E6 – DPQERPRKL HLA-A*08:01 - BA: -9,1 Kcal/mol 	32 b) HPV 16 - Proteína E6 – DPQERPRKL HLA-A*08:01 - BA: -9,1 Kcal/mol 
33 a) HPV 45 - Proteína E7 – TLQEVILHL HLA-A*08:01 - BA: -8,3 Kcal/mol 	33 b) HPV 45 - Proteína E7 – TLQEVILHL HLA-A*08:01 - BA: -8,3 Kcal/mol 

34 a) HPV 33 - Proteina E5 – LLRPILLSI HLA-A*08:01 - BA: -9.2 Kcal/mol 	34 b) HPV 33 - Proteina E5 – LLRPILLSI HLA-A*08:01 - BA: -9.2 Kcal/mol 
35 a) HPV 33 - Proteina E7 – TLKEYVLDL HLA-A*08:01 - BA: -7.6 Kcal/mol 	35 b) HPV 33 - Proteina E7 – TLKEYVLDL HLA-A*08:01 - BA: -7.6 Kcal/mol 
36 a) HPV 58 - Proteina E7 – TLREYVLDL HLA-A*08:01 - BA: -9.2 Kcal/mol 	36 b) HPV 58 - Proteina E7 – TLREYVLDL HLA-A*08:01 - BA: -9.2 Kcal/mol 
37 a) HPV 16 - Proteina E7 – LQPETTDLY HLA-A*15:01 - BA: -8.7 Kcal/mol 	37 b) HPV 16 - Proteina E7 – LQPETTDLY HLA-A*15:01 - BA: -8.7 Kcal/mol 
38 a) HPV 31 - Proteina E6 – FAFTDLTIVY HLA-A*15:01 - BA: -9.8 Kcal/mol 	38 b) HPV 31 - Proteina E6 – FAFTDLTIVY HLA-A*15:01 - BA: -9.8 Kcal/mol 
39 a) HPV 52 - Proteina E7 – TSNYIYIVY HLA-A*15:01 - BA: -7.8 Kcal/mol 	39 b) HPV 52 - Proteina E7 – TSNYIYIVY HLA-A*15:01 - BA: -7.8 Kcal/mol 

40 a) 	40 b) HPV 18 - Proteína E5 – TSPATAFVY HLA-A*35:01 - BA -9,6 Kcal/mol 
41 a) 	41 b) HPV 45 - Proteína E5 – SPLTAFAVY HLA-A*35:01 - BA -8,5 Kcal/mol 
42 a) 	42 b) HPV 31 - Proteína E5 – IPLFVIHITH HLA-A*35:01 - BA -9,8 Kcal/mol 
43 a) 	43 b) HPV 31 - Proteína E6 – FAFTDLTIVY HLA-A*35:01 - BA -10 Kcal/mol 
44 a) 	44 b) HPV 52 - Proteína E5 – SPFKVFFLY HLA-A*35:01 - BA -10,6 Kcal/mol 
45 a) 	45 b) HPV 52 - Proteína E7 – TSNYIVTY HLA-A*35:01 - BA -8,8 Kcal/mol 

46 a)		46 b)	HPV 16 - Proteína E5 – DPQERPRKLL HLA-A*51:01 - BA -8.8 Kcal/mol 
47 a)		47 b)	HPV 18 - Proteína E5 – TSPATAFTVY HLA-A*53:01 - BA -8.6 Kcal/mol 
48 a)		48 b)	HPV 45 - Proteína E5 – SPLTAFVY HLA-A*53:01 - BA -8.6 Kcal/mol 
49 a)		49 b)	HPV 31 - Proteína E5 – IPLFVIHTH HLA-A*53:01 - BA -7.4 Kcal/mol 
50 a)		50 b)	HPV 31 - Proteína E6 – FAFDTLTIVY HLA-A*53:01 - BA -8.5 Kcal/mol 
51 a)		51 b)	HPV 58 - Proteína E5 – VLSIYAW HLA-A*53:01 - BA -8.9 Kcal/mol 



APENDICE F

Sequência da construção Multiepitopos e do vetor

>MULTIEPITPO-PENTAVALENTE-AMINOACIDOS

ASMHHHHHHHAAYLFLIHTHARFAAYTSPATAFTVYAAYSPLTAFAYVYAAIPLFVIHT
HAAYLLRPLILSIAAYVLSISYAWAAYSPFKVFFLYAAAYVDAAYDPQERPRKLAAYKL
PDLCTELAAYNSVYGETLEKAAAYFAFTDLTIVYAAAYRFHNISGRWAAYNYSLYGETLA
AYTLHELCEVLAAYPGAAYLQPETTDLYAAAYTLQDIVLHLAAYTLQEIVLHLAAYTLQD
YVLDLAAYTLKEYVLDLAAYTLREYILDLAAYTSNYYIVTYAAAYTATAAYLE

>MULTIEPITPO-PENTAVALENTE-NUCLEOTIDEOS

GCTAGCATGCATCATCATCATCATCATGCGGCGTATCTGTTTCTGATTCATA
CCCATGCGCGCTTTGCGGCGTATACCAGCCCGGCGACCGCGTTTACCGTGTAT
GCGGCGTATAGCCCGCTGACCGCGTTTTCGGTGTATGCGGCGTATATTCCGCT
GTTTGTGATTCATACCCATGCGGCGTATCTGCTGCGCCCGCTGATTCTGAGCAT
TGCGGCGTATGTGCTGAGCATTAGCATTTATGCGTGGGCGGCGTATAGCCCGTT
TAAAGTGTTTTTCTGTATGCGGCGTATGTGCGACGCGGCGTATGATCCGCAGGA
ACGCCCGCGCAAACTGGCGGCGTATAAACTGCCGGATCTGTGCACCGAACTGG
CGGCGTATAACAGCGTGTATGGCGAAACCCTGGAAAAAGCGGCGTATTTTTCGT
TTACCGATCTGACCATTGTGTATGCGGCGTATCGCTTTCATAACATTAGCGGCCG
CTGGGCGGCGTATAACTATAGCCTGTATGGCGAAACCCTGGCGGCGTATACCCT
GCATGAACTGTGCGAAGTGCTGGCGGCGTATCCCGGGGCGGCGTATCTGCAGC
CGGAAACCACCGATCTGTATGCGGCGTATACCCTGCAGGATATTGTGCTGCATC
TGGCGGCGTATACCCTGCAGGAAATTGTGCTGCATCTGGCGGCGTATACCCTGC
AGGATTATGTGCTGGATCTGGCGGCGTATACCCTGAAAGAATATGTGCTGGATC
TGGCGGCGTATACCCTGCGCGAATATATTCTGGATCTGGCGGCGTATACCAGCA
ACTATTATATTGTGACCTATGCGGCGTATACCAGCGACCGCGGCGTATCTCGAG

>MULTIEPITPO + PVAX.

GACTCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGT
TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
CGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTT
TCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTAC
ATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG
GCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTAC
ATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCC
ATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCGAAAT
GTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG
GAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGG
CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCATGCAT
CATCATCATCATCATCATGCGGCGTATCTGTTTCTGATTCATACCCATGCGCGCT
TTGCGGCGTATACCAGCCCGGCGACCGCGTTTACCGTGTATGCGGCGTATAGC
CCGCTGACCGCGTTTTCGGTGTATGCGGCGTATATTCCGCTGTTTGTGATTCAT
ACCCATGCGGCGTATCTGCTGCGCCCGCTGATTCTGAGCATTGCGGCGTATGTG
CTGAGCATTAGCATTTATGCGTGGGCGGCGTATAGCCCGTTTAAAGTGTTTTTTC
TGTATGCGGCGTATGTGCGACGCGGCGTATGATCCGCAGGAACGCCCGCGCAAA
CTGGCGGCGTATAAACTGCCGGATCTGTGCACCGAACTGGCGGCGTATAACAG

CGTGTATGGCGAAACCCTGGAAAAAGCGGCGTATTTTGC GTTTACCGATCTGAC
CATTGTGTATGCGGCGTATCGCTTTCATAACATTAGCGGCCGCTGGGCGGCGTA
TAACTATAGCCTGTATGGCGAAACCCTGGCGGCGTATACCCTGCATGAACTGTG
CGAAGTGCTGGCGGCGTATCCCGGGGCGGCGTATCTGCAGCCGGAAACCACC
GATCTGTATGCGGCGTATACCCTGCAGGATATTGTGCTGCATCTGGCGGCGTAT
ACCCTGCAGGAAATTGTGCTGCATCTGGCGGCGTATACCCTGCAGGATTATGTG
CTGGATCTGGCGGCGTATACCCTGAAAGAATATGTGCTGGATCTGGCGGCGTAT
ACCCTGCGCGAATATATTCTGGATCTGGCGGCGTATACCAGCAACTATTATATTG
TGACCTATGCGGCGTATACCGCGACCGCGGCGTATCTCGAGTCTAGAGGGCCC
GTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG
TTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCC
TTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCACTTATT
CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA
GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGGCGGTTTTAT
GGACAGCAAGCGAACCAGGAAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGG
AAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTCTCGCCGCCAAGGATCTGATGGCGC
AGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAA
CAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCG
CTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCT
GTCAGCGCAGGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCC
TGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGC
GTTCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCT
GCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGC
CGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCC
GGCTACCTGCCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA
CTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAG
GGGCTCGCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACG
GCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTG
GAAAATGGCCGCTTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGA
CCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGG
CGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGA
GCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTATTAACGCTTAC
AATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCA
TACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTC
TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCA
ATAATAGCACGTGCTAAACTTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCC
TTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCG
TCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCG
TAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTGCC
GGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCA
GATACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAC
TCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCT
GCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCG
GATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCT
TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA
GCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTAT
CTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGAT
GCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTA
CGTTCTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT