

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

TRIAGEM VIRTUAL DE POTENCIAIS LIGANTES PARA A ONCOPROTEÍNA
E6 DO HPV TIPO 16

ANA LUIZA ARAÚJO BORGES

“Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.”

UBERLÂNDIA - MG

JULHO - 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

TRIAGEM VIRTUAL DE POTENCIAIS LIGANTES PARA A ONCOPROTEÍNA
E6 DO HPV TIPO 16

ANA LUIZA ARAÚJO BORGES

PROF. DR. NILSON NICOLAU JUNIOR

“Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.”

UBERLÂNDIA - MG
JULHO - 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

TRIAGEM VIRTUAL DE POTENCIAIS LIGANTES PARA A ONCOPROTEÍNA
E6 DO HPV TIPO 16

ANA LUIZA ARAÚJO BORGES

PROF. DR. NILSON NICOLAU JUNIOR
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA - IBTEC

Homologado pela coordenação do Curso de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

UBERLÂNDIA - MG

JULHO - 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

TRIAGEM VIRTUAL DE POTENCIAIS LIGANTES PARA A ONCOPROTEÍNA
E6 DO HPV TIPO 16

ANA LUIZA ARAÚJO BORGES

Aprovado pela Banca Examinadora em: Nota: ____

Uberlândia, 1 de Julho de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe **Maria Gloria**
que nunca deixou de acreditar em mim.

We can always begin again.

AGRADECIMENTOS

Chega ao fim mais uma jornada na minha vida e agradeço em especial á Deus que iluminou e abençoou meu caminho, agradeço o apoio dado pela minha família, principalmente minha mãe Glória pelos ensinamentos que formou a pessoa que sou hoje, pelo estímulo, força e paciência que sempre teve, a minha irmã Isadora que esteve comigo nos melhores e piores momentos, ao meu tio Fernando, minhas tias Maria Luiza e Rosa pelo incentivo e o suporte que me deram.

Aos meus amigos que estiveram presentes em toda minha graduação principalmente a Karen Ramos, Daniel Martins, Kassio Coelho e Layssa Giaretta.

As minhas amigas Lorena e Isabela que sempre me encorajaram na realização deste grande sonho e que estarão guardados eternamente nas minhas lembranças.

Ao professor Nilson que estendeu a mão e me fez me apaixonar novamente pela pesquisa.

RESUMO

O papilomavírus humano (HPV) pertence à família Papillomaviridae, gênero *Papillomavirus*. O HPV é uma infecção altamente prevalente em todo o mundo, este vírus de DNA infecta a mucosa genital e tem alto potencial carcinogênico, estando relacionado ao aumento do risco de lesões do trato genital, como o câncer do colo do útero. O câncer do colo do útero é uma das principais causas de mortes no mundo. Embora existam mais de 200 tipos de HPV identificados, os mais comumente associados ao câncer do colo do útero são os HPV dos tipos 16 e 18. Os dois genes do HPV, E6 e E7, são conhecidos por desempenhar um papel crucial no desenvolvimento do câncer. E estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* demonstram que a função das proteínas E6 e E7, particularmente dos "tipos de alto risco", é essencial para a formação de tumores. Estes oncogenes são capazes de alterar as vias de regulação do gene envolvidas no controle do ciclo celular, interagindo e neutralizando as funções reguladoras de duas importantes proteínas supressoras de tumor, p53 e pRb (Retinoblastoma Protein). Assim, há uma necessidade evidente de desenvolver abordagens terapêuticas mais eficientes. Uma abordagem para identificar potenciais ligantes da proteína E6 se dá pela uso de técnicas como triagem virtual e docagem molecular.. Neste trabalho, foi possível selecionar compostos com maior afinidade a proteína E6 do HPV do tipo 16 utilizando de bancos de dados de moléculas com características *druglike* e compostos naturais.

Palavras-chave: HPV, proteína E6, câncer do colo do útero, p53, LxxLL, triagem virtual.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Triagem virtual	2
1.2	O vírus do Papiloma Humano (HPV): Aspectos gerais	2
1.3	Patologia	4
1.4	Proteína E6	8
1.5	Vacinas e tratamento.....	9
2	OBJETIVO	10
2.1	Objetivo específicos	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1	Seleção e geração de modelo baseado na forma do ligante da proteína E6 ...	11
3.2	Geração de banco de dados de confôrmeros de ligantes	11
3.3	Triagem virtual em banco de dados de compostos	13
3.4	Docagem Molecular e Avaliação.....	13
3.5	Análise da toxicidade <i>in silico</i>	13
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1	Geração do modelo baseado em forma.....	13
4.2	Geração de banco de dados de confôrmeros de ligantes	14
4.3	Triagem virtual em banco de dados de compostos e docagem.....	15
4.4	Análises toxidade <i>in silico</i>	19
4.5	Geração de diagramas da interação 2D proteína-ligante	21

5	CONCLUSÃO	26
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 Triagem virtual

O processo de triagem *in silico* de bibliotecas de compostos para uma certa atividade é conhecida como triagem virtual (VS, do inglês "Virtual Screening"). Este método é geralmente definido como um processo em que grandes bibliotecas de compostos são automaticamente avaliadas usando técnicas computacionais (DOMINGUES, 2013). Tais técnicas para identificar moléculas farmacologicamente ativas ganharam impulso adicional com o surgimento de softwares e bancos de dados de ligantes, disponíveis gratuitamente, fáceis de usar impulsionando assim a evolução das abordagens *in silico* (CHATTERJEE et al., 2019).

O objetivo principal de uma triagem virtual é o de identificar os compostos de uma biblioteca que tenham maior probabilidade de se ligar a um alvo biológico. Com os avanços tecnológicos, a cada dia fica mais palpável a realização e aplicação prática dos conceitos de triagem virtual, em particular na otimização de compostos em espaços químicos que sejam acessíveis sinteticamente e que, concomitantemente, estejam de acordo com os padrões farmacofóricos exigidos para o espaço químico de fármacos e substâncias bioativas (ALMEIDA et al., 2012).

1.2 O vírus do Papiloma Humano (HPV): Aspectos gerais

O vírus do papiloma humano (HPV) foi isolado a partir de verrugas genitais e depois clonado por Gissmann e Villiers no final da década de 1970 (DE VILLIERS; GISSMANN; ZUR HAUSEN, 1981). Posteriormente estudos moleculares e epidemiológicos demonstraram convincentemente que a infecção por HPV com certos genótipos, desempenha um papel essencial no desenvolvimento do câncer do colo do útero (SHUYAMA et al., 2007).

O HPV é um vírus que pertence à família *Papillomaviridae* (AL-SHABANAH et al., 2013), têm tropismo pelo epitélio escamoso da pele e das mucosas (CAMARA et al., 2008), possui genoma circular de DNA de fita dupla com aproximadamente 8000 pares de base (pb) (DE VILLIERS et al., 2004). O HPV é caracterizado pela presença de três regiões: genes que codificam as proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7, genes que codificam as proteínas estruturais L1 e L2, e uma região de controle transcricional denominada região de controle longo (*Long Control Region* - LCR) (FIGURA 1) (KAJITANI et al., 2012).

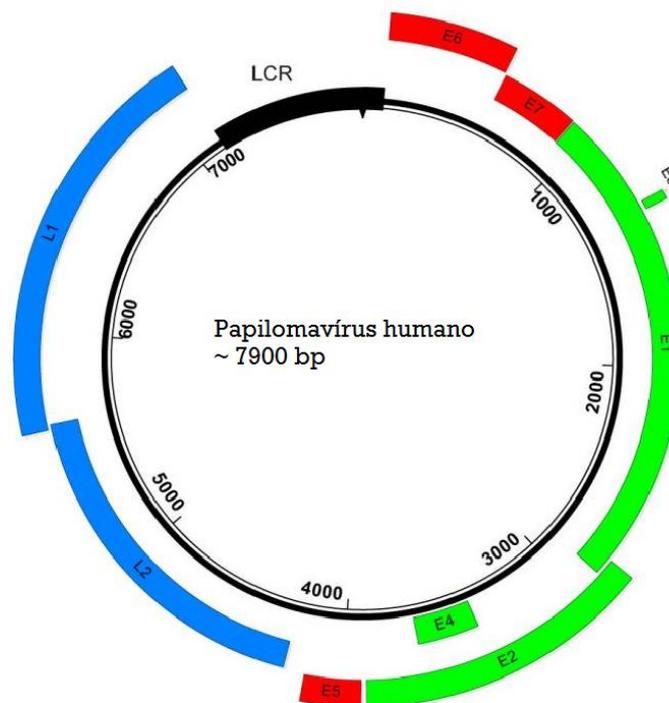


Figura 1. Mapa do genoma do HPV. O genoma é de DNA de fita dupla (dsDNA) de aproximadamente 8000 bp. A região de genes iniciais (*Early genes*- E) são mostrados em verdes e os genes tardios (*Late genes*- L) são mostrados em azul. A região de LCR, que regula a transcrição e a replicação do DNA viral, é mostrada por uma caixa preta. Três oncogenes de HPV, E5, E6 e E7, são mostrados em vermelho. Adaptado de (SPURGEON; LAMBERT, 2017)

O capsídeo do HPV é formado por duas proteínas virais, o principal componente é a proteína L1 e o componente menor a proteína L2. Enquanto L1 desempenha um papel essencial na manutenção da integridade estrutural do capsídeo, a proteína L2 desempenha um papel importante para assegurar que o genoma viral seja conduzido corretamente para o

núcleo da célula, onde a expressão de genes virais iram se iniciar (BRONIARCZYK et al., 2017), essas proteínas são essenciais para os eventos iniciais de infecção, como ligação de vírus na membrana plasmática, entrada celular e transporte do DNA viral para o núcleo (GRÄSSEL et al., 2016).

Todos os papilomavírus conhecidos codificam cinco proteínas: E1, E2 e E4, constituindo o capsídeo viral, enquanto E1 e E2 influenciam o ciclo de replicação e transcrição, a proteína E4 contribui para a eficiência de amplificação do genoma e favorece a expressão de alto nível do vírus. As proteínas E5, E6, E7, tem um papel fundamental na regulação do crescimento celular, no processo de transformação, e são consideradas oncogênicas. A transformação maligna está predominantemente associada à atividade das proteínas E6 e E7, que promovem a proliferação celular e previnem a apoptose (GARBUGLIA, 2014).

1.3 Patologia

Os HPVs formam um grupo grande e diverso de vírus com 174 tipos completamente caracterizados (BZHALAVA et al., 2013). Aproximadamente um terço infecta especificamente o trato genital (ELDAKHAKHNY et al., 2018) e eles são divididos em carcinogênicos de alto risco e de baixo risco, dependendo do seu potencial para causar câncer (MENON et al., 2016). Infecções com tipos de baixo risco podem causar alterações nas células cervicais benignas ou de baixo grau, verrugas genitais e papilomatose respiratória recorrente. Os tipos de HPV de alto risco atuam como agentes cancerígenos no desenvolvimento de câncer cervical e outros tipos de câncer (MARKOWITZ et al., 2014), como anogenitais, da vulva, vagina, pênis, ânus e região periungueal e aproximadamente 20% dos cânceres de cabeça e pescoço, particularmente da língua, amígdala e orofaringe (HUANG et al., 2012).

Os tipos de baixo risco, como HPV6, 11, 40, 42, 43 e 44, estão associados a verrugas genitais. Os tipos de alto risco incluem 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 e contribuem para 96,6% do câncer cervical invasivo diagnosticado em todo o mundo (CHEN et al., 2017). Os tipos 16 e 18 do HPV que contribuem para o desenvolvimento de 66% dos casos de câncer cervical (LOKE; CHAN; WONG, 2017). A maioria das infecções por HPV são transitórias e assintomáticas e não causam problemas clínicos; 70% das novas infecções por HPV desaparecem no prazo de 1 ano e aproximadamente 90% são dentro de 2 anos. O risco de persistência e progressão para lesões pré-cancerosas varia de acordo com o tipo de HPV, sendo o HPV 16 mais oncogênico do que outros tipos de HPV de alto risco (MARKOWITZ et al., 2014).

O HPV infecta os epitélios escamosos e entra nas células da camada basal que são expostas após trauma ou ferimento (GALLOWAY et al., 2016). O desgaste, leva ao desnudamento da membrana basal (*Basement membrane* - BM) das células epiteliais, fornece acesso aos queratinócitos basais. Durante o curso da infecção pelo vírus HPV, o vírus liga-se aos proteoglicanos de sulfato de heparina (*Heparan sulfate proteoglycans* - HSPGs) e / ou laminina 5 na BM através da proteína L1 principal da cápside. Isto desencadeia alterações conformacionais no capsídeo que expõem ainda mais a proteína L2 do capsídeo, incluindo um sítio conservado no amino terminal L2 que é suscetível a clivagem por uma furina extracelular. A clivagem de furina de L2 revela vários epítomos protetores conservados de L2, incluindo os resíduos 17-36, na superfície do capsídeo e é crítico para a infecção. Isto é seguido pela absorção do vírus no queratinócito basal. Nas células basais infectadas (que podem incluir células), o genoma viral replica e estabelece ~ 50 cópias de epissoma de HPV, que então segregam entre a progênie filha quando as células sofrem divisão celular. As proteínas virais iniciais E6 e E7 são a chave para estimular a proliferação continuada e o meio para a replicação do genoma viral vegetativo dirigido por E1 e E2 para um número de cópias muito

elevado. A diferenciação terminal de células infectadas nas camadas epiteliais superiores ativa a expressão de E4 e, em seguida, L1 e L2 para empacotar os números de cópias muito altos do genoma viral. Os vírions são liberados à medida que o E4 desintegra os filamentos de citoqueratina e os remanescentes de queratinócitos são removidos da superfície epitelial. Assim, o ciclo de vida viral é completado sem causar diretamente a morte celular e sem viremia sistêmica ou inflamação aparente para evitar alertar as respostas imunes locais (RODEN; STERN, 2018). (Figura 2)

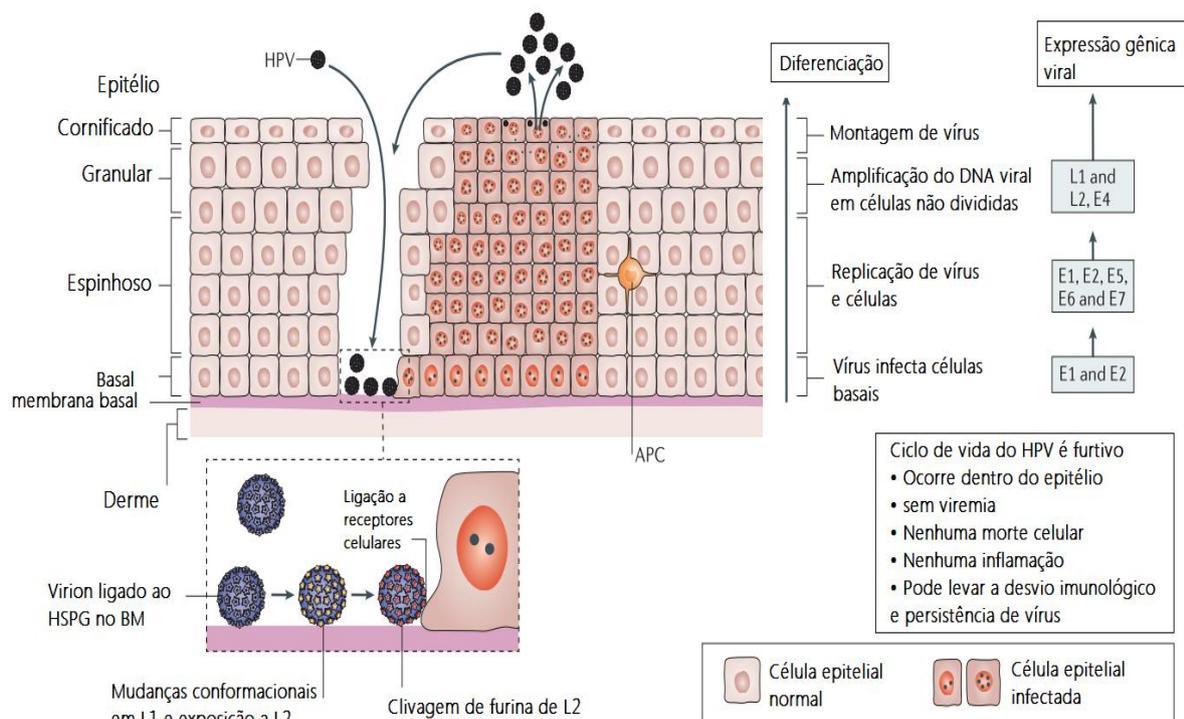


Figura 2. O ciclo de replicação do HPV. Adaptado de (RODEN; STERN, 2018)

O ciclo de replicação do genoma do HPV pode ser dividido em três estágios: primeiro, a replicação amplificacional do genoma viral após a entrada inicial; em segundo lugar, replicação de manutenção estável em proliferação de células infectadas, que envolve a segregação e partição dos plasmídeos virais em células filhas após a divisão celular; e, em terceiro lugar, a replicação amplificada do genoma viral na diferenciação de queratinócitos não divididos, que fornece os genomas virais que serão empacotados e liberados na forma de

vírions (GEIMANEN et al., 2011).

Em todo o mundo, cerca de 630 milhões de pessoas estão infectadas e estima-se que ocorram mais de 500 mil novas infecções anualmente (OWSIANKA; GAŃCZAK, 2015). O HPV está associado ao câncer cervical invasivo (*Invasive cervical cancer - ICC*), um importante problema de saúde pública, que depois do câncer de mama, é um dos principais responsáveis pelas mortes do sexo feminino (ZARDO et al., 2014). Cerca de 30% das lesões de HPV persistem ou avançam para lesões de maior grau, com maior potencial para progredir para o câncer (ZHANG et al., 2018). Os tipos de HPV de alto risco expressam proteínas E6 e E7 oncogênicas, e sua expressão é necessária para a transformação maligna de células infectadas ocorrer (ZHANG et al., 2018) que, ao desregulamentar múltiplas vias celulares, incluindo o controle do ciclo celular e a apoptose, induzem a imortalização celular e, eventualmente, a malignidade (BOON et al., 2015).

Os ciclos de vida dos tipos de HPV de baixo risco e de alto risco diferem em sua capacidade de gerar a entrada do ciclo celular e aumentar a proliferação celular nas camadas das células basais (HUANG et al., 2012). O HPV pode induzir carcinogênese através da expressão das oncoproteínas E6 e E7, que atuam inativando as proteínas supressoras de tumores a p53 e a proteína retinoblastoma (*Retinoblastoma protein - pRb*) (MEULENDIJKS et al., 2015) que leva a desregulamentação do ciclo celular. Os tipos 16 e 18 do HPV são os vírus oncogênicos mais comuns entre os HPVs causadores do câncer. Além disso, enquanto a infecção por HPV requer o aparecimento de cicatrização e inflamação de feridas, em alguns casos, as citocinas pró-inflamatórias podem desencadear a transformação maligna. A inflamação induzida por tumores, por sua vez, pode promover a proliferação e sobrevivência de células malignas e pode alterar dos agentes terapêuticos alvo de câncer (BODA et al., 2018).

1.4 Proteína E6

Embora todos os genes codificados pelo genoma do HPV sejam cruciais durante os diferentes estágios de replicação e o ciclo de vida viral, os dois genes mais importantes no HPV de alto risco são o E6 e o E7, também conhecidos como oncogenes. Eles foram denominados oncogenes virais devido a seus alvos na célula e às implicações dessa desregulação.

Como discutido anteriormente, embora o alvo principal de E6 e E7 sejam p53 e pRb, respectivamente, muitas pesquisas mostraram que há muitos outros alvos de E6 e E7 que permitem que os tipos de HPV de alto risco sejam tumorigênicos. Estudos mostraram que o HPV16 E6 sozinho é capaz de imortalizar células epiteliais mamárias humanas, permitindo-lhe superar o mecanismo do estágio de mortalidade M1, ou seja, evitar a senescência e exibir uma vida útil prolongada (YEO-TEH; ITO; JHA, 2018). O HPV regula as vias celulares através de vários mecanismos para exercer um efeito na célula infectada. A proteína E6 associada (E6AP) é codificada pelo gene *UBE3A* e é o membro fundador da família E3 de ligases de ubiquitina HECT (homóloga ao terminal carboxilo E6AP). A E6AP é uma proteína celular cuja desregulação foi implicada na síndrome de Angelman (SA), um grave distúrbio do neurodesenvolvimento. No entanto, no contexto de células infectadas por HPV, o alvo mais proeminente da E6AP é o regulador celular crucial, p53, mais facilmente conhecido como o *guardião do genoma*. E6 liga-se à sequência de consenso LxxLL (YEO-TEH; ITO; JHA, 2018) denominadas motivos LD, que medeiam as interações proteína-proteína que regulam a motilidade celular, adesão celular e expressão gênica e são capazes de degradar o p53 (ZANIER et al., 2014).

Os motivos LxxLL são definidos como hélices anfipáticas ricas em leucina com substituição limitada de leucina por resíduos hidrofóbicos e pelo menos um aminoácido

carregado negativamente numa posição X (SPANGLE; GHOSH-CHOUDHURY; MUNGER, 2012).

1.5 Vacinas e tratamento

Os estudos sobre as vacinas para HPV começaram na década de 1980, e os resultados se materializaram apenas em 2006, quando as duas vacinas contendo proteínas virais L1 foram produzidas por técnicas de recombinação genética (BODA et al., 2018). Desde de então, as vacinas foram aprovadas para uso em mais de 100 países (SANTHANES et al., 2018). A vacina bivalente *Cervarix*® (GlaxoSmithKline Vaccines) protege contra HPV16/18. A vacina quadrivalente *Gardasil*® (Merck and Co., Inc ..) protege contra HPV16/18 (LOKE; CHAN; WONG, 2017) e os tipos de baixo risco HPV6/11 que são responsáveis pela maioria das verrugas genitais (KING et al., 2015).

Na infecção por HPV, o vírus estimula a imunidade humoral (mediada por anticorpos monoclonais), bem como a imunidade mediada por células (mediada por linfócitos T) no corpo humano. O corpo sintetiza anticorpos para proteínas de superfície L1 e L2; no entanto, a intensidade da resposta imune varia de indivíduo a indivíduo e depende do tipo de HPV que causa a infecção e sua persistência. As duas vacinas são montadas com partículas morfolologicamente semelhantes ao do capsídeo viral, mas não contêm o genoma. Assim, estas vacinas não apresentam risco infeccioso ou oncogênico, pois apenas estimulam anticorpos específicos (BODA et al., 2018). No entanto, essas vacinas não são eficazes na eliminação de infecções preexistentes, uma vez que os antígenos-alvo, proteínas do cápsideo L1, não são expressos em células epiteliais basais infectadas. Portanto, o grande número de indivíduos já infectados pelo HPV não se beneficia das vacinas atuais (CHABEDA et al., 2018).

O risco de infecção pelo HPV começa desde o início da atividade sexual, e a taxa de aquisição de infecção é maior em adolescente. Portanto, a população-alvo para os programas de vacinação saúde pública organizadas atuais é as adolescentes antes de início da vida sexual

(APTER et al., 2015). A vacina não protege os pacientes já infectados com nenhuma dos tipos virais estudados (tipos 6, 11, 16, 18 e 16, 18), mas a vacina tetravalente pode prevenir (44%) lesões cervicais em pacientes que foram previamente infectados e receberam apenas uma ou duas das três doses necessárias de vacina (HUANG et al., 2012). Se amplamente disseminadas, as vacinas bivalente e quadrivalente poderiam prevenir mais de dois terços dos casos de câncer do colo do útero em todo o mundo e a maioria dos cânceres vulvares, vaginais e anais relacionados ao HPV em mulheres (BROTHERTON et al., 2016).

Não existe ainda uma cura para uma infecção por HPV. Existem tratamentos aprovados, como crioterapia, procedimentos de excisão maiores, terapia a laser e eletrocirurgia, que não eliminam completamente o DNA de HPV, levando a 40% de chance de recorrência de infecção. Os estimulantes do sistema imunológico bem como ácido tricloroacético e podofilotoxina têm 50% de eficiência e uma taxa de recorrência relativamente alta (TOOTS et al., 2017).

As terapias existentes são consideradas invasivas e reforçam a necessidade de medicamentos específicos visando o tratamento da infecção por HPV, de preferência sem restrição a subtipos específicos (TOOTS et al., 2017).

2 OBJETIVO

Buscar potenciais ligantes para a estrutura tridimensional da Proteína E6 do vírus do papiloma humano por meio da construção de modelo baseado em forma, triagem virtual e ancoragem molecular.

2.1 Objetivo específicos

- ✚ Construir um modelo, baseado no peptídeo LxxLL, extraído do complexo com a estrutura da proteína E6 do HPV tipo 16.

- ✚ Realizar uma triagem virtual baseada no modelo em bibliotecas de confôrmeros de pequenos ligantes.
- ✚ Estudar a interação receptor-ligante, por meio da técnica de docagem molecular.
- ✚ Analisar os resultados da docagem molecular por meio de funções de pontuação dos compostos.
- ✚ Avaliar a toxicidade, *in silico*, dos compostos selecionados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção e geração de modelo baseado na forma do ligante da proteína E6

A proteína E6, código 4GIZ foi extraída do banco de dados do Protein Data Bank (PDB) (BERMAN et al. , 2000). A sequência de aminoácidos do peptídeo LxxLL da proteína E6AP apresenta-se complexada a esta estrutura. Visando à triagem virtual em bibliotecas de ligantes, um modelo foi gerado a partir do ligante LxxLL. Esta etapa foi realizada com ajuda do programa vROCS 3.2.0.4, "OpenEye Scientific Software", Santa Fe, NM (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007).

vROCs é um programa baseado no método de comparação de forma, com base na ideia de que as moléculas têm forma semelhante se os seus volumes se sobrepõem adequadamente. Embora vROCS seja primariamente um método baseado em forma, o usuário pode definir, para regiões específicas do modelo, características químicas descritas como: doadoras de hidrogênio, aceptoras de hidrogênio, aníons, cátions, hidrofóbicas e regiões de anéis aromáticos. Dessa forma, são formados modelos que, durante processo de sobreposição, facilitam a identificação dos compostos que são semelhantes na forma e na química.

3.2 Geração de banco de dados de confôrmeros de ligantes

O modelo gerado por meio do programa vROCS foi usado na triagem virtual de bibliotecas de compostos originários de dois bancos de dados da "Chembridge Corporation",

San Diego, Califórnia, mais especificamente as 2 bibliotecas DIVERSet™ EXP e CL, que foram cuidadosamente selecionadas para proporcionar a mais ampla cobertura do espaço farmacofórico, e totalizam 100.000 compostos de diversas estruturas *druglike*. Foram usados também, na triagem virtual, o banco de dados de moléculas provenientes de produtos naturais brasileiros (NuBBE) com 2.218 compostos e o banco ZINC (IRWIN et al., 2012), mais especificamente a biblioteca DrugsNow com aproximadamente 10 milhões de compostos.

Essas bibliotecas de compostos foram submetidas ao programa FILTER do OMEGA 2.5.1.4, "OpenEye Scientific Software", Santa Fe, NM (HAWKINS et al., 2010). O FILTER é um programa de rápida filtragem e seleção de compostos, que usa uma combinação de cálculos de propriedades físicas e o conhecimento de grupos funcionais. Ele foi usado antes da análise experimental para remover compostos indesejáveis, como compostos com funções tóxicas, com baixa biodisponibilidade oral, com alta probabilidade de formar ligações covalentes com o alvo proteico e de compostos com probabilidade de interferência no ensaio experimental.

Os compostos da biblioteca filtrada por meio do FILTER foram submetidos ao programa QUACPAC 1.6.3.1, "OpenEye Scientific Software", Santa Fe, NM (<http://www.eyesopen.com>), com o intuito de gerar compostos com cargas precisas ou pelo menos representadas de forma consistente. Para tanto, o QUACPAC enumera o pKa e os tautômeros de cada composto, a fim de obter os estados de protonação corretas. Após a enumeração de pKa e tautômeros, a biblioteca de compostos foi submetida à geração de confôrmeros por meio do programa OMEGA. O OMEGA gera bancos de dados de multi-confôrmeros bioativos de compostos com alta velocidade e confiabilidade. A geração de confôrmeros é um passo essencial para a triagem virtual utilizando modelos farmacofóricos, pois estes dependem de conformações bioativas para alcançar resultados satisfatórios.

3.3 Triagem virtual em banco de dados de compostos

O modelo previamente gerado serviu de base para triagem nas bibliotecas de ligantes. A triagem virtual foi realizada pelo programa ROCs e consistiu em utilizar o modelo baseado em forma para a sobreposição moléculas advindas de bancos de dados de confôrmeros. O ROCS é uma técnica rápida e realiza a triagem virtual a uma taxa de 500 confôrmeros por segundo.

3.4 Docagem Molecular e Avaliação

As bibliotecas de compostos geradas a partir da busca pelo modelo foram submetidas à técnica de docagem molecular. Para tanto, foi utilizado o programa GOLD, que calcula a docagem flexível entre as proteínas e os ligantes. O programa GOLD usa um algoritmo genético, que busca soluções por meio de ancoragem propagando múltiplas cópias de modelos flexíveis do ligante no sítio ativo do receptor, recombinando segmentos desta cópia aleatoriamente até um conjunto convergido de estruturas.

3.5 Análise da toxicidade *in silico*

A toxicidade do compostos selecionados após a docagem foram avaliadas com auxílio do software online pkCSM. Esta etapa foi fundamental para predizer se os potenciais inibidores apresentam os parâmetros adequados para a seleção de drogas, visando à administração no organismo humano.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Geração do modelo baseado em forma

O tratamento do HPV tem como objetivo inicial eliminar os sintomas, amenizar a carga psicológica decorrente do estigma social e melhorar o aspecto estético do paciente, principalmente no que se refere aos condilomas. No presente estudo a sequência escolhida para dar origem ao modelo baseado em forma foi a sequência LxxLL, utilizada em estudos

anteriores por Zanier et al., 2013. A sequência consiste em 1 leucina seguida de dois aminoácidos variáveis e outras 2 leucinas. Mutações nessa sequência de aminoácidos são responsáveis por induzir tumores, sendo assim, a utilização de um ligante peptídico como modelo pode ser a chave para reduzir a propagação e geração de tumores por HPV. Dessa forma, a avaliação das interações possibilitou, por meio do programa vROCs a geração de um modelo baseado em forma (Figura 3), que possui 3 pontos de anel (esferas amarelas), representando as interações hidrofóbicas e 5 pontos de aceptores de hidrogênio (esfera vermelha) e forma do peptídeo LxxLL (cinza).

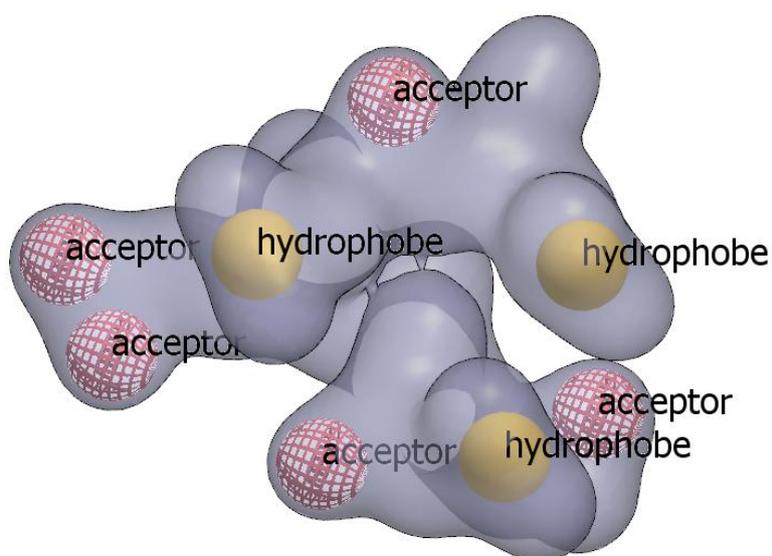


Figura 3. Figura representando o modelo gerado a partir do peptídeo LxxLL. Os pontos em vermelho, os pontos farmacofóricos de aceptores de elétrons, e em amarelo, as interações hidrofóbicas. Em cinza, está representado a forma (volume) do modelo.

4.2 Geração de banco de dados de confôrmeros de ligantes

Para a execução do procedimento de triagem virtual, a utilização de uma biblioteca virtual de compostos químicos é uma etapa crucial que deve fornecer compostos com o maior grau possível de diversidade molecular, sejam eles já conhecidos e consagrados por suas atividades biológicas e terapêuticas, sejam compostos já sintetizados e disponíveis para ensaios biológicos, moléculas hipotéticas (desenhadas em computador antes da síntese) ou até

produtos de origem natural. A qualidade da base de dados utilizada é de vital importância, pois é a fonte de onde serão selecionados os compostos promissores para futuros ensaios biológicos. Para tanto, visando ensaios de triagem virtual, os bancos de dados de ligantes DIVERSet™ EXP e CL, NuBBE e ZINC foram preparadas com o intuito de retirada de compostos indesejáveis e geração de tautômeros e de confôrmeros bioativos.

4.3 Triagem virtual em banco de dados de compostos e docagem

A estratégia de triagem virtual baseada na estrutura do alvo-molecular está associada à busca de ligantes através de métodos computacionais que consideram a estrutura 3D de um alvo terapêutico. O objetivo central é o de prever compostos de uma base de dados capazes de interagir com o sítio ligante do alvo-molecular e ordenar estas moléculas de acordo com a sua afinidade pelo sítio receptor, com o intuito de identificar ligantes promissores com potencial atividade farmacológica (ALMEIDA et al., 2012). Os bancos de dados DIVERSet™ EXP e CL, NuBBE e ZINC foram triados virtualmente através do programa ROCS, resultando nas 500 melhores moléculas para cada banco de dados. As melhores moléculas foram ranqueadas segundo a função de pontuação TanimotoCombo, que avalia quanto os ligantes se adequaram a forma e características químicas do modelo.

As 500 melhores moléculas ranqueadas de cada banco de dados após a triagem foram submetidas à ancoragem molecular, através do programa GOLD e pontuadas segundo o algoritmo CHEMPLP. Nos cálculos de docagem, as funções de escore desempenham duas tarefas principais durante as etapas de triagem virtual. Primeiramente, são usadas para diferenciar e avaliar as diversas conformações e orientações que um mesmo ligante pode adotar no sítio receptor. Em seguida, após a realização de simulações com diversos ligantes contidos em bases de dados, a função de escore é aplicada para estimar a afinidade de ligação dos diversos complexos ligante-receptor estudados e, dessa forma, classificá-los de acordo com sua afinidade, facilitando assim a diferenciação entre ligantes promissores e moléculas

não-ligantes (ALMEIDA et al., 2012). As melhores soluções dos complexos obtidos pela docagem foram analisadas de acordo com as interações intermoleculares, tais como ligação de hidrogênio, van der Waals e interações hidrofóbicas. Os 10 melhores compostos de cada biblioteca previamente triada foram selecionados de acordo com a pontuação CHEMPLP (Tabelas 1,2,3 e 4).

Tabela 1: Ligantes de melhor pontuação de docagem oriundos do banco de dados EXP.

Ranking	Código do ligante	CHEMPLP
1.	43536	74.7040
2.	20577	73.2405
3.	24409	73.2167
4.	26729	72.7902
5.	44373	72.2445
6.	23974	72.0953
7.	5794	71.4548
8.	19307	71.3728
9.	19377	71.2176
10.	44329	70.8459

Tabela 2: Ligantes de melhor pontuação de docagem oriundos do banco de dados CL.

Ranking	Código do ligante	CHEMPLP
1.	12038	68.0735
2.	13043	66.9890
3.	16522	66.8596
4.	9147	66.0524
5.	12803	65.6829
6.	15142	65.6802
7.	31759	65.6501
8.	3611	65.1118
9.	12060	64.8272
10.	15122	64.2934

Tabela 3: Ligantes de melhor pontuação de docagem oriundos do banco de dados NUBBE.

Ranking	Código do ligante	CHEMPLP
1.	89	75.9539
2.	675	75.1938
3.	2329	73.4634
4.	2330	71.6511
5.	681	70.0602
6.	1084	70.0405
7.	16288	69.9693
8.	412	69.9036
9.	578	68.9231
10.	1650	67.9746

Tabela 4: Ligantes de melhor pontuação de docagem oriundos do banco de dados ZINC.

Ranking	Código do ligante	CHEMPLP
1.	17143435	78.9559
2.	03143971	77.7981
3.	06074246	75.9879
4.	20419195	74.9499
5.	33813433	74.6959
6.	13085775	73.9210
7.	05402135	73.4832
8.	03143971	72.6582
9.	03143970	72.58759
10.	22844730	72.1770

Abaixo segue dois exemplos dos complexos resultantes da docagem (Figuras 4 e 5).

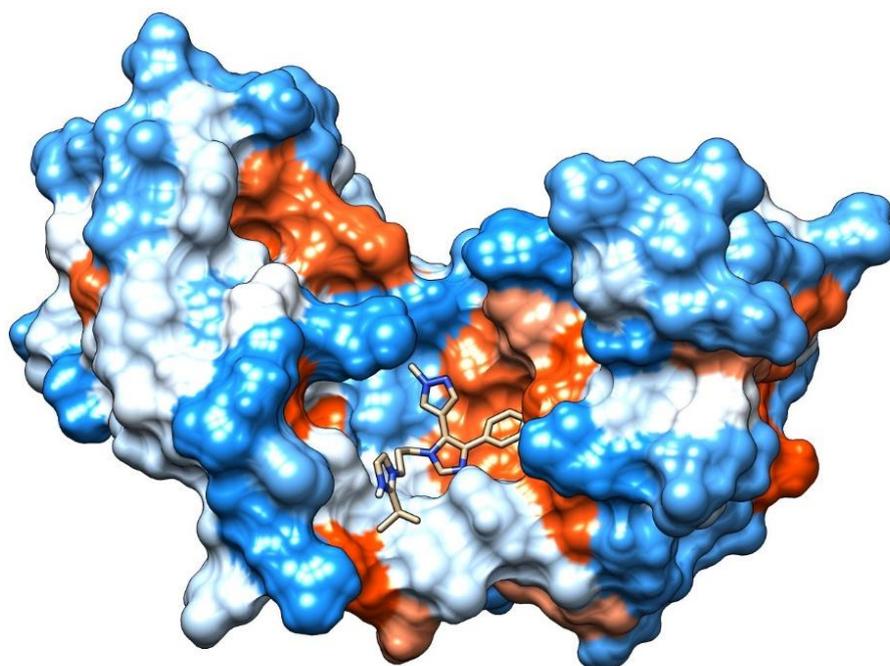


Figura 4. Representação da estrutura 3D da proteína 4GIZ interagindo com o composto 44329 do banco de dados CL. Azul representa os aminoácidos hidrofílicos e laranja os hidrofóbicos.

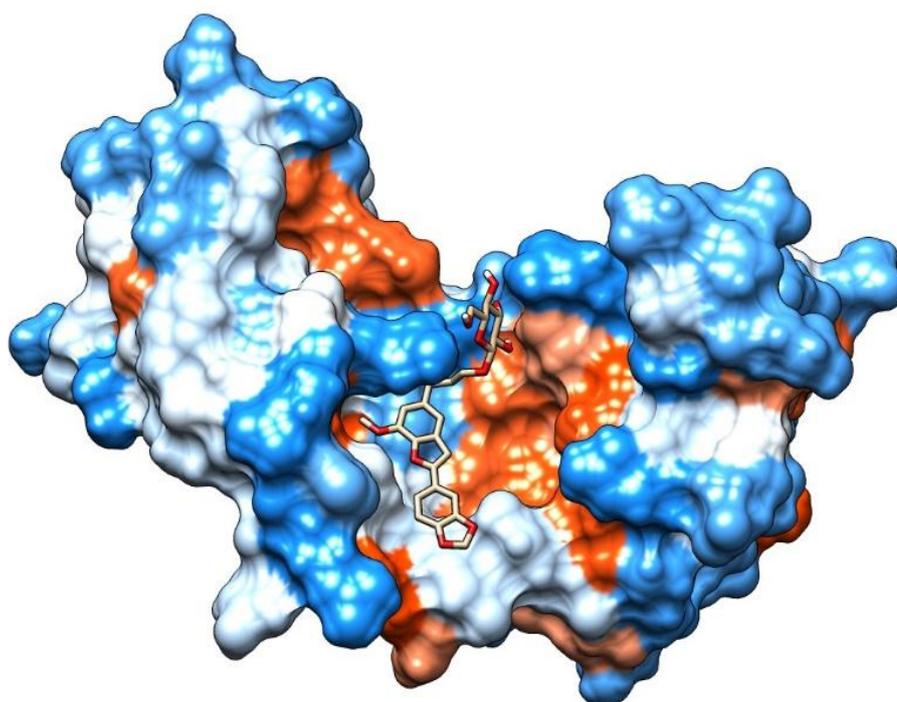


Figura 5. Representação da estrutura 3D da proteína 4GIZ interagindo com o composto 412, do banco de dados NUBBE. Azul representa os aminoácidos hidrofílicos e laranja os hidrofóbicos.

4.4 Análises toxicidade *in silico*

Os estudos *in silico* de compostos com potencial terapêutico, permitem o estudo de suas propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção, juntamente com toxicidade) e tem como vantagem a rapidez na sua execução, o baixo custo e a capacidade de reduzir o uso de animais em ensaios de toxicidade (OLIVEIRA, 2017).

As 10 moléculas com melhor pontuação de cada banco de dados foram submetidas a uma predição de toxicidade. Foram selecionados os ligantes: 44329 do banco de dados CL; 31759 do banco de dados EXP e os ligantes 1628 e 412 do NUBBE, pois apresentavam mais valores positivos em sua avaliação, portanto, possivelmente mais apropriados para administração como droga oral.

Os atributos de toxicidade analisados para os ligantes foram: Toxicidade de AMES, Dose Máxima Tolerada – Humana, Toxicidade oral aguda em ratos (DL50), Toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL), Hepatotoxicidade, toxicidade em *T. pyriformis* e Inibidor hERG.

O teste de Ames baseia-se na capacidade de uma molécula em induzir mutação reversa em cepas de bactérias, sendo um dos pontos mais importantes na avaliação da segurança de compostos (SALGUEIRO, 2017). Nenhum dos compostos selecionados induziram mutação.

A dose Máxima Tolerada – Humana é uma estimativa do limite da dose máxima. Expressa em Log (mg/kg/dia), valores iguais ou abaixo de 0,477 são considerados baixos, ou seja, a dose necessária para causar toxicidade é baixa; já o restante dos valores é considerado alto, ou seja, a dose necessária para causar toxicidade é alta. Somente o composto 31759 apresentou um dose alta.

A toxicidade aguda oral em ratos é o valor de LD50 em ratos de um dado composto, ou seja, a quantidade, em mol/kg da molécula, necessária para matar 50% dos animais testados.

Nesse caso, a menor dose testada no estudo é chamada de LOAEL (lowest observed adverse effect level), sendo a menor dose (testada) na qual foi observado um aumento estatisticamente ou biologicamente significativo na frequência ou severidade dos efeitos adversos quando os grupos tratados são comparados ao grupo controle negativo (AMARAL, 2013).

A hepatotoxicidade é um fator muito considerado no desenvolvimento de drogas, uma vez que injúrias no tecido hepático causadas pelo uso crônico de fármacos são intensificadas com a duração do tratamento, desta forma, compostos com pouca ou nenhuma hepatotoxicidade são ideais no tratamento a longo prazo. Todos os compostos selecionados tiveram hepatotoxicidade predita como negativa

A toxicidade em *T. pyriformis* é um teste de IGC50, ou seja, inibição de 50% do crescimento do protozoário, onde valores maiores que -0,5 são considerados tóxicos, desta forma, todos os compostos são considerados tóxicos neste parâmetro. Todos os compostos apresentaram valores altos.

Sabe-se que substâncias inibidoras de hERG podem desencadear arritmias ventriculares fatais, sendo que uma grande quantidade de drogas já foi retirada de ensaios clínicos ou do mercado devido as mortes associadas à inibição destes receptores. Todas as moléculas obtiveram resultados idênticos, sendo classificadas como não inibidoras da hERGI.

Tabela 5: Valores das predições de toxicidade dos ligantes 44329 do banco de dados CL; o ligante 31759 do banco de dados EXP; os ligantes 1628 e 412, gerados pelo servidor pkCSM Pharmacokinetics.

Parâmetros avaliados	44329	31759	1628	412
Toxicidade de AMES	NO	NO	NO	NO
Dose Máxima Tolerada – Humana	0.472	0.602	0.455	0.472
Toxicidade oral aguda em ratos (DL50)	2.451 mol/kg	3.21 mol/kg	1.963 mol/kg	2.766 mol/kg
Toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL)	1.03 mg/kg p.c./dia	1.18 mg/kg p.c./dia	2.18 mg/kg p.c./dia	3.73 mg/kg p.c./dia
Hepatotoxicidade	NO	NO	NO	NO
Toxicidade em <i>T.Pyriformis</i>	0.285	0.288	1.258	0.285
Inibidor hERG	NO	NO	NO	NO

4.5 Geração de diagramas da interação 2D proteína-ligante

O programa LigPlot+ foi usado para gerar diagramas de interação 2D proteína-ligante dos ligantes com melhores resultados de toxicidade. Nos diagramas é possível visualizar o

ligante (roxo) no sítio ativo da proteína. As formas vermelho-tijolo representam resíduos de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas, ao passo que as linhas tracejadas verdes representam ligações de hidrogênio.

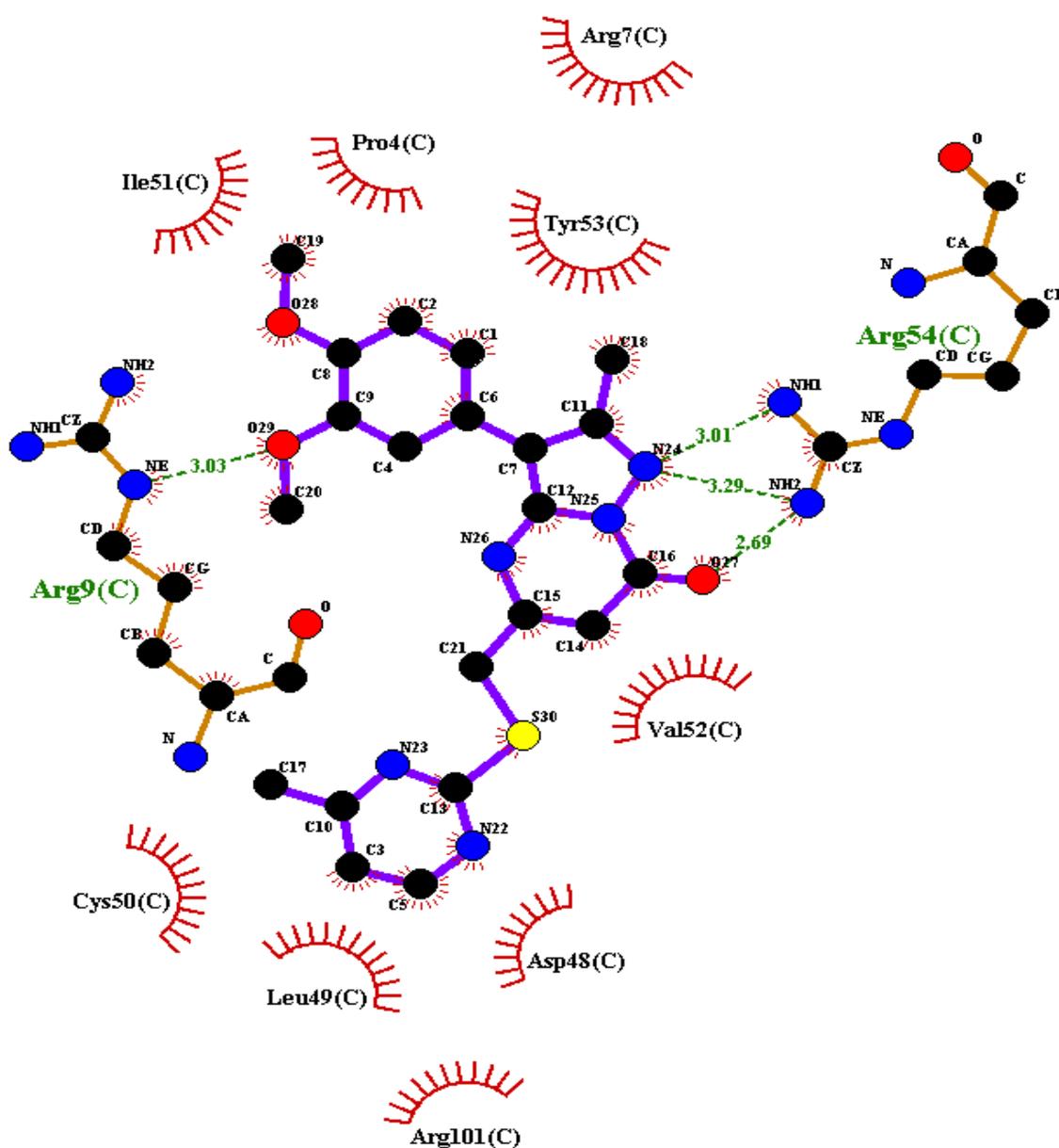


Figura 6. Interação do ligante 31759 extraído do banco de dados EXP. O ligante, em roxo, no sítio ativo da proteína. A cor marrom representa os aminoácidos; as formas vermelho tijolo, as interações hidrofóbicas e as linhas tracejadas verdes representam as ligações de hidrogênio.

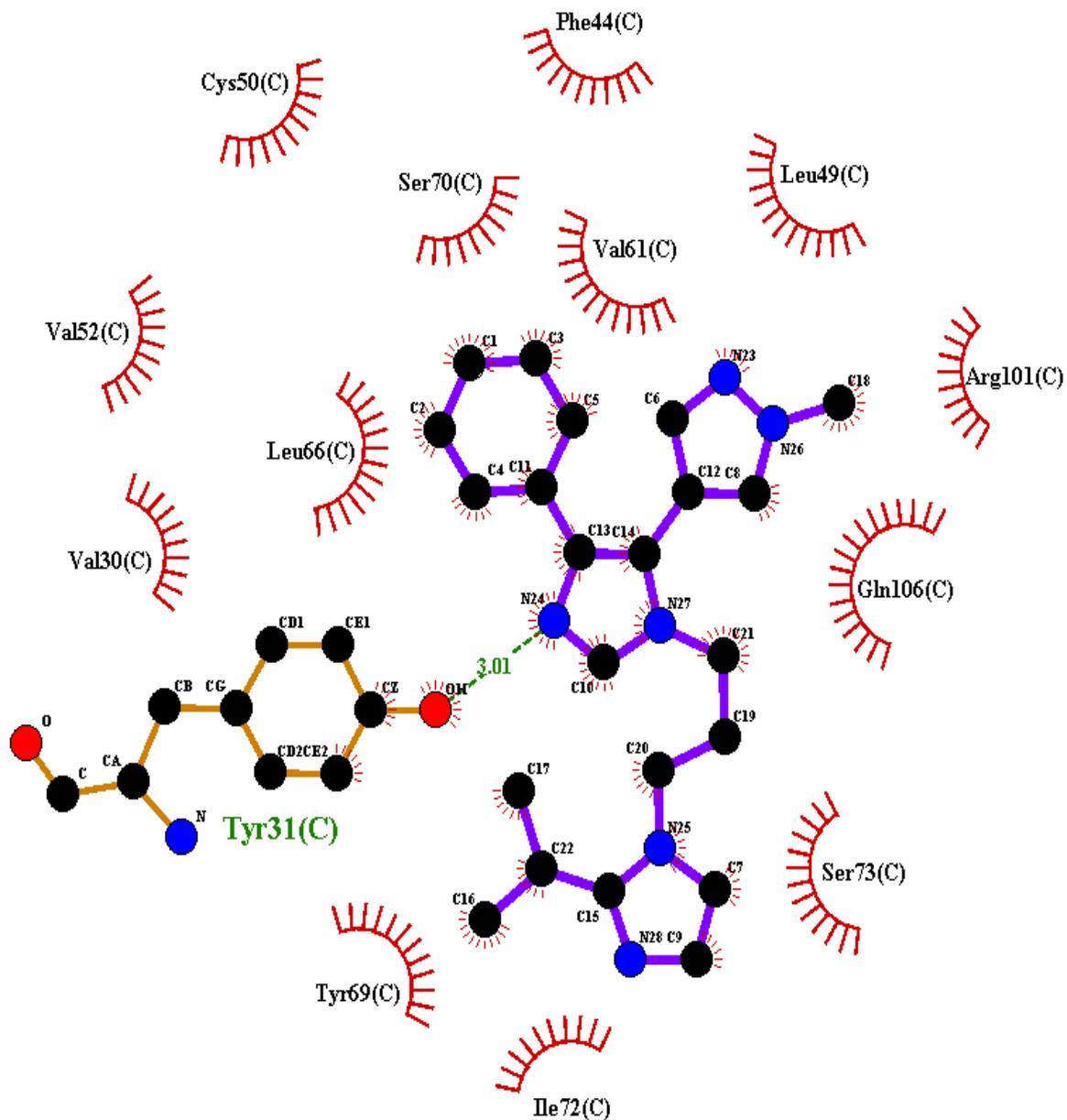


Figura 7. Interação do ligante 44329 extraído do banco de dados CL. O ligante, em roxo, no sítio ativo da proteína. A cor marrom representa os aminoácidos; as formas vermelhas tijolo, as interações hidrofóbicas e as linhas tracejadas verdes representam as ligações de hidrogênio.

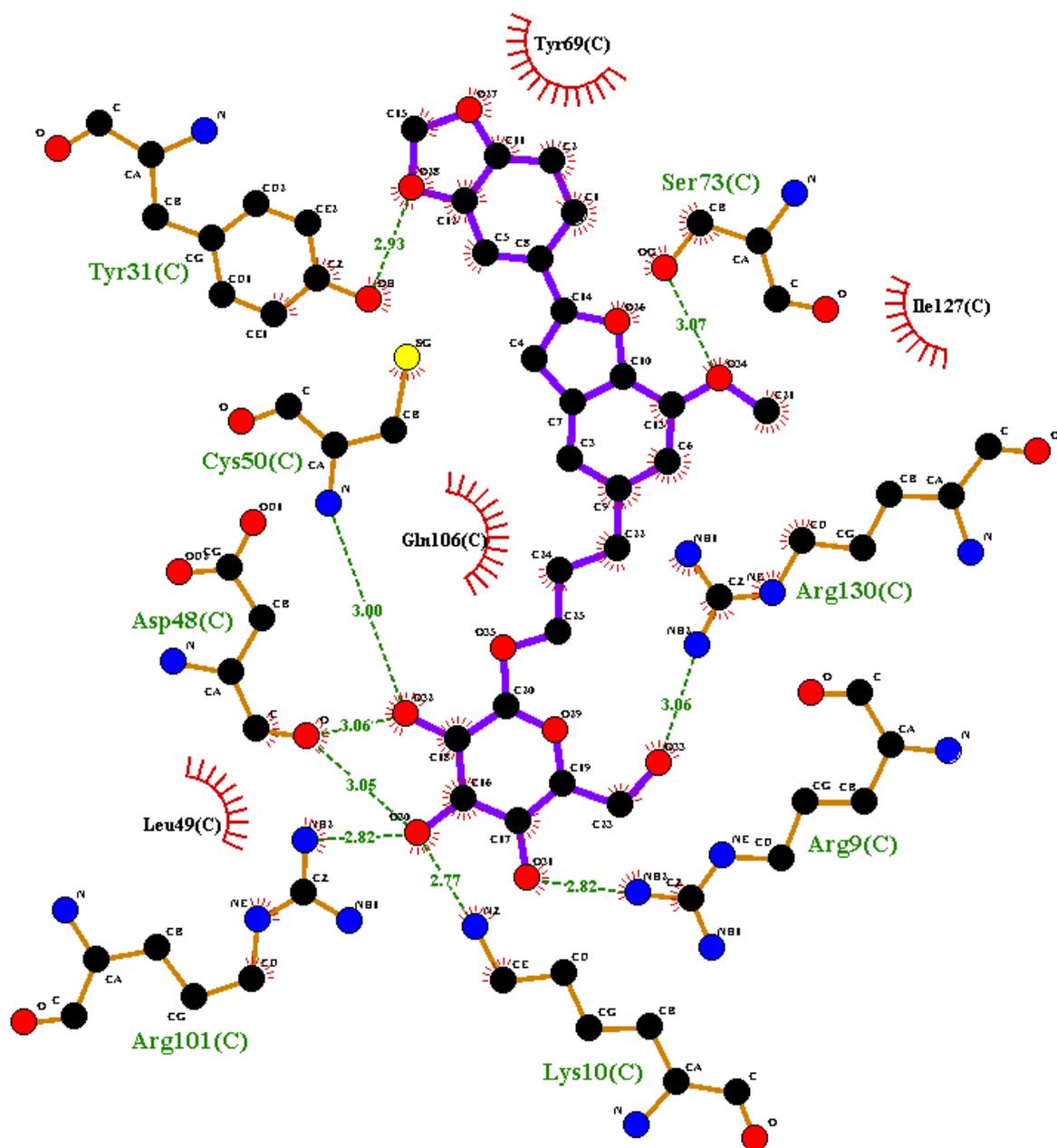


Figura 8. Interação do ligante 412 extraído do banco de dados NuBBE. O ligante, em roxo, no sítio ativo da proteína. A cor marrom representa os aminoácidos; as formas vermelhas tijolo, as interações hidrofóbicas e as linhas tracejadas verdes representam as ligações de hidrogênio.

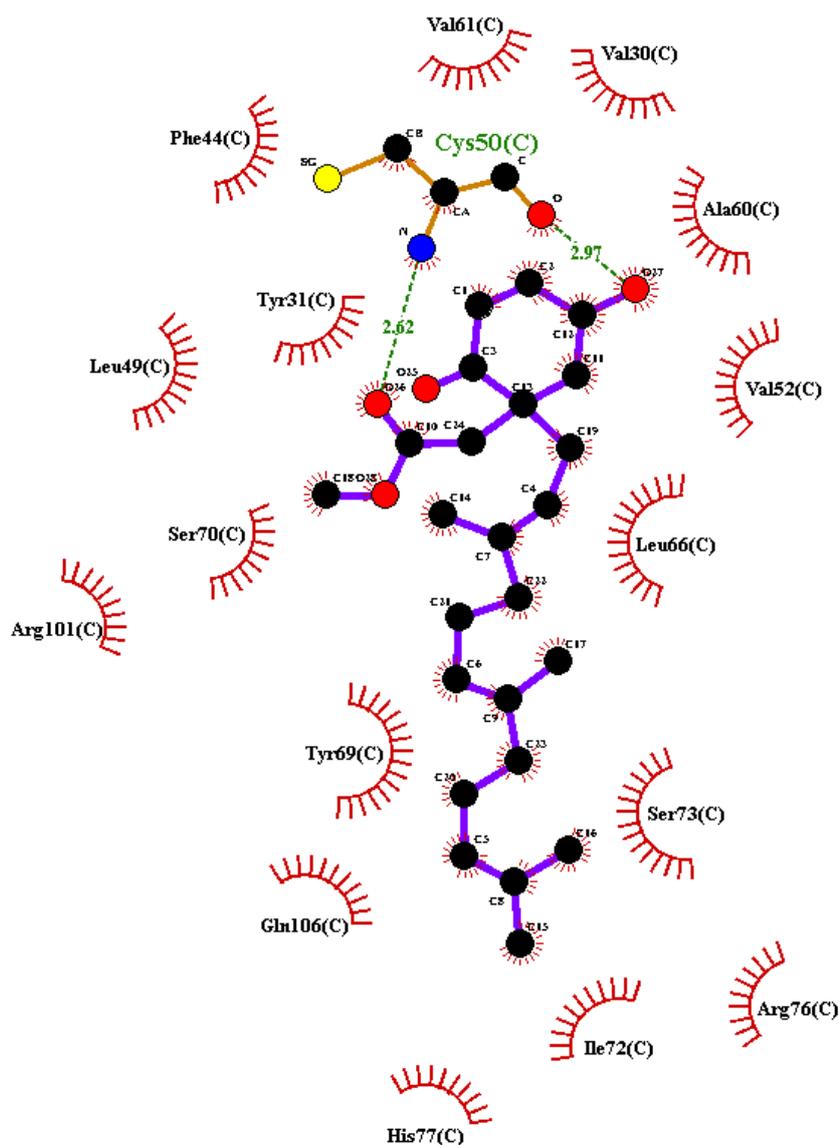


Figura 9. Interação do ligante 1628 extraído do banco de dados NuBBE. O ligante, em roxo, no sítio ativo da proteína. A cor marrom representa os aminoácidos; as formas vermelhas tijolo, as interações hidrofóbicas e as linhas tracejadas verdes representam as ligações de hidrogênio.

Os ligante que se destacou é proveniente do banco de dados do NuBBE (Figura 8). O ligante realiza diversas ligações de hidrogênio com a proteína; isso denota uma potencial maior estabilidade na proteína-ligante.

A ligação de hidrogênio é uma interação atrativa que ocorre entre um átomo de hidrogênio de uma molécula ou de um fragmento molecular D – H, em que D é um átomo

mais eletronegativo que H (como, por exemplo, O, N, F e S) e um átomo ou um grupo funcional na mesma molécula ou em uma molécula adjacente (CUNHA, 2017). Sabe-se que as ligações de hidrogênio são as mais importantes interações não covalentes em sistemas biológicos, sendo em grande parte responsáveis pela manutenção das conformações bioativas de proteínas (α -hélices e folhas β), além de serem responsáveis pelas notáveis propriedades físico-químicas da água. Os termos que mais contribuem energeticamente para sua estabilidade são a energia eletrostática e uma reduzida troca de energia de repulsão (CASTILHO, 2011).

O objetivo final deste projeto foi triar potenciais ligantes da proteína E6 do HPV, neste sentido, a presença de compostos naturais com resultados positivos durante a triagem, talvez indiquem uma novidade em relação ao tratamento do HPV a fim de reduzir sua capacidade de indução de tumores utilizando produtos potencialmente menos tóxicos.

Até o momento, não existe uma terapêutica comprovadamente capaz de erradicar o HPV, nem um tratamento ideal para todos os pacientes. Desta forma, a utilização da triagem in silico de bibliotecas de compostos é uma alternativa de se alcançar resultados mais confiáveis, de maneira mais rápida e com menor custo.

5 CONCLUSÃO

O câncer do colo do útero é o terceiro câncer mais comum em mulheres e o quinto câncer global mais comum em todo o mundo, o principal fator causal da doença é uma infecção persistente com HPV de alto risco, com indivíduos incapazes de montar uma resposta imune suficiente contra o vírus.

Por intermédio da triagem virtual, tem-se a possibilidade de testar um vasto número de compostos, teoricamente, qualquer composto pode se ligar a um receptor, contudo para que um composto seja considerado um fármaco, é preciso apresentar características que o tornem

aptos a serem administrados a pacientes. Se um composto é conhecidamente tóxico, mutagênico será automaticamente excluído do processo inicial de identificação de potenciais candidatos a fármaco, os resultados mostraram quatro prováveis potenciais ligantes para a estrutura tridimensional da proteína E6 do HPV, o ligante 44329 do banco de dados CL; o ligante 31759 do banco de dados EXP; os ligantes 1628 e 412 do banco NuBBe. O composto 412 do banco NuBBe se destacou em relação os quatros prováveis ligantes, pois realiza diversas ligações de hidrogênio com receptor.

O banco brasileiro NuBBe mostrou-se muito importante para esse trabalho, resultando no achado de uma molécula com potencial para a pesquisa no futuro, exaltando a importância da biodiversidade brasileira na busca de novos medicamentos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SHABANAH, O. A. et al. Human papillomavirus genotyping and integration in ovarian cancer Saudi patients. **Virology Journal**, v. 10, p. 1–9, 2013.

ALMEIDA, D. et al. Artigo Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. v. 4, n. 6, p. 739–776, 2012.

AMARAL, L. M. S. DO. Análise crítica dos valores de Ingestão Diária Aceitável estabelecidos para praguicidas no Brasil, em relação as agências internacionais e a Agência de Proteção Ambiental Americana, e suas implicações na avaliação do risco. 2013.

APTER, D. et al. Efficacy of human papillomavirus 16 and 18 (HPV-16/18) AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer in young women: Final event-driven analysis of the randomized, double-blind PATRICIA trial. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 4, p. 361–373, 2015.

BODA, D. et al. Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). **International Journal of Oncology**, p. 637–655, 2018.

BOON, S. S. et al. Cancer-Causing Human Papillomavirus E6 Proteins Display Major Differences in the Phospho-Regulation of Their PDZ Interactions. **Journal of Virology**, v. 89, n. 3, p. 1579–1586, 2015.

BRONIARCZYK, J. et al. The VPS4 component of the ESCRT machinery plays an essential role in HPV infectious entry and capsid disassembly. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–11, 2017.

BROTHERTON, J. M. L. et al. Monitoring the impact of HPV vaccine in males- Considerations and challenges. **Papillomavirus Research**, v. 2, p. 106–111, 2016.

BZHALAVA, D. et al. A systematic review of the prevalence of mucosal and

cutaneous human papillomavirus types. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 224–231, 2013.

CAMARA, G. N. N. D. L. et al. Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 149–158, 2008.

CASTILHO, L. N. P. **DOCKING MOLECULAR APLICADO AO ESTUDO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS ENTRE ANÁLOGOS DE RESVERATROL E DERIVADOS DE 1,2,3-TRIAZOL E A ENZIMA COX-2.** [s.l: s.n.].

CHABEDA, A. et al. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. **Papillomavirus Research**, v. 5, n. August 2017, p. 46–58, 2018.

CHATTERJEE, D. et al. ImmtorLig _ DB: repertoire of virtually screened small molecules against immune receptors to bolster host immunity. **Scientific Reports**, n. August 2018, p. 1–13, 2019.

CHEN, X. et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in 961,029 screening tests in southeastern China (Zhejiang Province) between 2011 and 2015. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4–11, 2017.

CUNHA, M. DA S. **Análise de Ligação de Hidrogênio por Superfície de Hirshfeld.** [s.l: s.n.].

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DE VILLIERS, E. M.; GISSMANN, L.; ZUR HAUSEN, H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. **Journal of virology**, v. 40, n. 3, p. 932–5, 1981.

DOMINGUES, B. F. 3D-Pharma: Uma Ferramenta para Triagem Virtual Baseada em Fingerprints de Farmacóforos. 2013.

ELDAKHAKHNY, S. et al. Human papillomavirus E7 induces p63 expression to modulate DNA damage response. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, p. 127, 2018.

GALLOWAY, D. A. et al. HHS Public Access. p. 87–92, 2016.

GARBUGLIA, A. R. Human papillomavirus in head and neck cancer. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1705–1726, 2014.

GEIMANEN, J. et al. Development of a Cellular Assay System To Study the Genome Replication of High- and Low-Risk Mucosal and Cutaneous Human Papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 85, n. 7, p. 3315–3329, 2011.

GRÄSSEL, L. et al. The CD63-Syntenin-1 Complex Controls Post-Endocytic Trafficking of Oncogenic Human Papillomaviruses. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–18, 2016.

HUANG, H. S. et al. Novel antivirals inhibit early steps in HPV infection. **Antiviral Research**, v. 93, n. 2, p. 280–287, 2012.

KAJITANI, N. et al. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. APR, p. 1–12, 2012.

KING, E. M. et al. Human papillomavirus DNA in men who have sex with men: Type-specific prevalence, risk factors and implications for vaccination strategies. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 9, p. 1585–1593, 2015.

LOKE, A. Y.; CHAN, A. C. O.; WONG, Y. T. Facilitators and barriers to the acceptance of human papillomavirus (HPV) vaccination among adolescent girls: a comparison between mothers and their adolescent daughters in Hong Kong. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 390, 2017.

MARKOWITZ, L. E. et al. Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports**, v. 63, n. RR-05, p. 1–30, 2014.

MENON, S. et al. Epidemiology of HPV genotypes among HIV positive women in

Kenya: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, 2016.

MEULENDIJKS, D. et al. HPV-negative squamous cell carcinoma of the anal canal is unresponsive to standard treatment and frequently carries disruptive mutations in TP53. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 8, p. 1358–1366, 2015.

OLIVEIRA, F. D. C. E. DE. **DESENVOLVIMENTO DE NANOSSISTEMAS CONTENDO TAMBJAMINAS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E VALIDAÇÃO IN VITRO EM LINHAGEM DE CÂNCER COLORRETAL (HCT-116)**. [s.l.: s.n.].

OWSIANKA, B.; GAŃCZAK, M. Evaluation of human papilloma virus (HPV) vaccination strategies and vaccination coverage in adolescent girls worldwide. **Przegląd Epidemiologiczny**, v. 69, n. 1, p. 53–58, 151–155, 2015.

RODEN, R. B. S.; STERN, P. L. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 4, p. 240–254, 2018.

SALGUEIRO, A. C. F. **DIABETES MELLITUS CONTROLAM O ESTRESSE OXIDATIVO E APRESENTAM BAIXA TOXICIDADE: AVALIAÇÃO IN SILICO, IN VITRO E IN VIVO DA “PATA -DE-V ACA” E “MACELA”**. 2017.

SANTHANES, D. et al. Factors influencing intention to obtain the HPV vaccine in South East Asian and Western Pacific regions: A systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3640, 2018.

SHUYAMA, K. et al. Human papillomavirus in high- and low-risk areas of oesophageal squamous cell carcinoma in China. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 10, p. 1554–1559, 2007.

SPANGLE, J. M.; GHOSH-CHOUDHURY, N.; MUNGER, K. Activation of Cap-Dependent Translation by Mucosal Human Papillomavirus E6 Proteins Is Dependent on the Integrity of the. v. 86, n. 14, p. 7466–7472, 2012.

SPURGEON, M. E.; LAMBERT, P. F. Human papillomavirus and the stroma: Bidirectional crosstalk during the virus life cycle and carcinogenesis. **Viruses**, v. 9, n. 8, 2017.

TOOTS, M. et al. Identification of several high-risk HPV inhibitors and drug targets with a novel high-throughput screening assay. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 1–27, 2017.

YEO-TEH, N. S. L.; ITO, Y.; JHA, S. High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. 2018.

ZANIER, K. et al. NIH Public Access. v. 339, n. 6120, p. 694–698, 2014.

ZARDO, G. P. et al. Vacina como agente de imunização contra o HPV. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 9, p. 3799–3808, 2014.

ZHANG, J. et al. Microparticles produced by human papillomavirus type 16 E7-expressing cells impair antigen presenting cell function and the cytotoxic T cell response. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.