UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

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

HUGO SANTOS LINTZ

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

UBERLÂNDIA – MG
NOVEMBRO DE 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

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

HUGO SANTOS LINTZ

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
NOVEMBRO DE 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

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

HUGO SANTOS LINTZ

PROF. DR. NILSON NICOLAU JUNIOR
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

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

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

UBERLÂNDIA – MG
NOVEMBRO DE 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

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

HUGO SANTOS LINTZ

Aprovado pela Banca Examinadora em: Nota:

Uberlândia, 25 de novembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Quando se chega ao fim de uma etapa na sua vida você se pega refletindo sobre muitas coisas. Nesses últimos quatro anos, em que estive cursando Biotecnologia, me ensinaram muito mais do que eu pensei que poderia aprender. Agradeço imensamente pelo apoio de todos que sempre estiveram perto de mim.

Aos meus pais que sempre me ajudaram de todas as formas que podiam, mesmo não sabendo muita coisa sobre o que eu estava fazendo.

Aos amigos, que conheci durante esse período na Universidade Federal de Uberlândia, que fizeram desse tempo nada mais que incrível durante todas as fases.

Ao professor Nilson que me ajudou em uma hora de muita necessidade e foi capaz de mudar meu pensamento com relação a esta monografia.

Aos membros da Banca examinadora que dedicaram seu tempo me ajudando a dar os passos finais na conclusão da graduação.

Sei que posso aparentar não estar devidamente satisfeito com a ajuda e o apoio de todos, mas fiquem sabendo que sou imensamente grato por tudo que passei nesses últimos momentos como graduando.

RESUMO

O Vírus do Papiloma Humano (HPV) é responsável por ser uma das causas principais de diversos tipos de câncer, como o de colo de útero, que é uma das principais causas de morte em todo mundo. Existem mais de 200 tipos de HPV identificados, dentro os quais os tipos 16 e 18 são os mais relacionados com o câncer de colo de útero. O vírus codifica duas proteínas que são conhecidas por desempenhar um papel crucial no desenvolvimento do câncer, a E6 e a E7. Estas oncoproteínas são capazes de alterar vias de regulação no controle do ciclo celular, neutralizando uma das proteínas importantes supressoras de tumores, a p53. Dessa forma, há uma clara importância em desenvolver novas abordagens para o tratamento contra HPVs de alto risco para o câncer, visto que ainda não há uma forma inteiramente eficiente nos estudos atuais. Este trabalho utilizou da técnica de triagem virtual e docagem molecular com o intuito de encontrar um potencial ligante para as proteínas oncogênicas de forma a impedir a proliferação do tumor. Assim foi possível selecionar compostos com maior afinidade à proteína E6 do HPV tipo 16 utilizando de banco de dados de moléculas com características *druglike* e compostos naturais.

Palavras-chave: HPV, proteína E6, triagem virtual, p53, câncer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 2

1.1 O vírus do Papiloma Humano 2

1.2 Patologia 3

1.3 Proteína E6 e Sequência LxxLL 3

1.4 Vacinação 4

1.5 Tratamento 5

1.6 Triagem Virtual 5

2. OBJETIVOS 5

2.1 Objetivos Gerais 5

2.2 Objetivos Específicos 6

3. MATERIÁIS E MÉTODOS 6

3.1 Seleção e geração de modelo baseado em forma 6

3.2 Gerações de banco de dados de confômeros de ligantes 6

3.3 Triagens virtuais em bancos de dados de compostos 7

3.4 Docagem Molecular e Avaliação 8

3.5 Análises da toxicidade *in* silico 8

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 9

4.1 Gerações do modelo baseado em forma 9

4.2 Triagens virtual em bancos de dados de compostos e docagem 10

4.3 Análises da toxicidade *in silico* 13

4.4 Geração de diagramas 2D da interação proteína-ligante 16

5. CONCLUSÃO 21

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 23

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Vírus do Papiloma Humano

O Vírus do Papiloma Humano (HPV em inglês) é um aglomerado de pequenos vírus de DNA encapsulados pertencente à família *Papillomaviridae*. São considerados um grupo diverso de vírus por apresentarem novos tipos de HPVs encontrados continuamente (BZHALAVA; EKLUND; DILLNER, 2015).

A infecção pelo HPV já foi estudada como uma das causas principais de câncer cervical, além disso, é um fator relevante em outros cânceres anogenitais (ânus, vulva, vagina e pênis), bem como cânceres de cabeça e pescoço. Os tipos 16 e 18 de HPV são responsáveis por cerca de 70% de todas os casos de cânceres em todo o mundo. (BRUNI, L.; ALBERTO, G.; SERRANO, B.; MENA, 2019).

O papiloma vírus humano tem uma organização gênica comum (Figura 1): uma região inicial que codifica genes não estruturais, a região tardia de genes estruturais e uma região reguladora (região de controle longo: LCR).

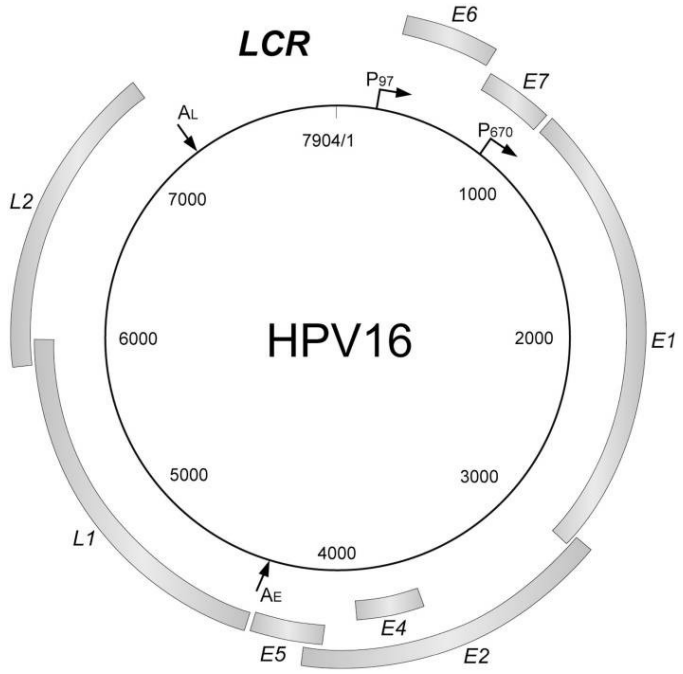

Figura1: O genoma do HPV tem uma estrutura circular de DNA de cadeia dupla. Os genes virais são transcritos em uma única direção (sentido horário). Existem genes que codificam proteínas não estruturais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e proteínas estruturais (L1, L2) e uma região de controle transcricional (região de controle longo; LCR). O LCR contém uma origem de replicação do DNA e funciona como o regulador da replicação do DNA. Fonte: (SAKAI, 2012)

Todos os papilomavírus conhecidos codificam cinco proteínas: E1, E2 e E4, L1 e L2. L1 e L2 são estruturais, constituindo o capsídeo viral, enquanto E1 e E2 influenciam o ciclo de replicação e transcrição, a proteína E4 contribui para a eficiência da amplificação do genoma e favorece o alto nível de expressão do vírus (SIDDIQA et al., 2019).

Em todos os papilomavírus, também encontramos uma região de controle longa (LCR) localizada entre L1 e o início da primeira *open reading frame* (ORF1) na região inicial. As ORFs são as sequencias de DNA compreendidas entre um códon de início (AUG) e um códon de término. As proteínas E5, E6 e E7 têm um papel fundamental na regulação do crescimento celular, no controle do imunossistema e no processo de transformação celular (GARBUGLIA, 2014).

1.2 Patologia

A classificação de HPV é baseada no nucleotídeo, que corresponde à codificação da ORF para a proteína L1. Os HPVs são um grupo grande e diverso de vírus, dos quais a maioria compreende três gêneros: o α-papilomavírus, isolados de lesões mucosas e genitais que incluem os 13 tipos virais classificados como oncogênicos; o β-papilomavírus (HPV cutâneo) e o γ-papilomavírus.(BZHALAVA; EKLUND; DILLNER, 2015).

Os tipos de baixo risco, como HPV 6, 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 contribuem para 96,6% do câncer cervical invasivo diagnosticado em todo o mundo. (LOKE et al., 2017).

De acordo com dados da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) os tipos 16 e 18 do HPV são responsáveis por 70% dos cânceres de colo de útero e lesões pré-cancerosas. Foram registrados cerca de 570 mil novos casos em todo o mundo no ano de 2018.

1.3 Proteína E6 e sequência LxxLL

Apesar da importância de estudar o genoma de todas as proteínas produzidas pelo vírus do HPV é necessário dar um destaque maior à proteína E6, visto que é classificada como ontogênica. Tal denominação se deve ao fato de seus alvos celulares e das implicações no organismo que estas causam.

A proteína E6 de HPV associa-se à proteína p53, que regula a passagem pelas fases G1/S e G2/M, funcionando como um supressor tumoral (MARTINEZ-ZAPIEN et al., 2016). E6 recruta as proteínas celulares, como é o caso das proteínas da família AP1 (E6-AP); atuando no complexo p53, podendo impedir o efeito supressor da proteína no ciclo celular. A formação desse complexo proteico resulta na degradação da p53 mediada por um complexo proteossômico (SOUTO, 2005).

A associação da proteína E6 com a p53 é mediada pela sequência de aminoácidos LxxLL da proteína E6-AP. que consiste em um aminoácido leucina seguidos por 2 aminoácidos variáveis e 2 outras leucinas (TINTS et al., 2014).

Esse peptídeo se torna essencial para a ligação de E6 a p53, uma vez que sem a sequência LxxLL as interações da p53 se tornam insuficientes para manter a conformidade da E6, o que deixa a molécula instável e, consequentemente, incapaz de realizar sua função biológica(BEAUDENON; HUIBREGTSE, 2008).

1.4 Vacinação

Pensando em prevenção, as vacinas profiláticas contra o HPV trouxeram a possibilidade de ações em nível primário. Visando o combate da disseminação do vírus e o controle das lesões HPV induzidas foram desenvolvidos dois tipos de vacinas contra o HPV, a profilática e a terapêutica (FARAH; MENDES, 2014).

A vacina profilática se caracteriza com morfologia semelhante ao vírus sem, contudo, conter o DNA viral, responsável pelo dano celular. Isso então estimula uma resposta humoral no corpo, fazendo com que ele se sensibilize. Por outro lado, a vacina terapêutica é produzida a partir de outras proteínas que têm sido propostas como antígenos vacinais. Exemplo disso são as proteínas E6 e E7 que estão envolvidas na proliferação e transformação celular (BORSATTO et al., 2011).

No Brasil foram aprovadas duas vacinas profiláticas contra o HPV, sendo elas: a bivalente *Cervarix* ® (GlaxoSmithKline Vaccines), que protege contra os tipos HPV16 e 18, e a quadrivalente da *Gardasil*® (Merck and Co., Inc ..), que, além dos tipos 16 e 18, também protegem contra HPV 6 e 11, responsáveis pela maioria das verrugas genitais.

No entanto, essas vacinas não são eficazes na eliminação de infecções preexistentes, uma vez que os antígenos-alvo, proteínas do capsídeo L1, não são expressos em células epiteliais basais infectadas. Portanto, o grande número de indivíduos já infectados pelo HPV não se beneficiam das vacinas atuais (CHABEDA et al., 2018).

1.5 Tratamento

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 (MUMM et al., 2017).

Além disso, as terapias existentes são consideradas invasivas o que reforça a necessidade de medicamentos específicos visando o tratamento da infecção por HPV. Dessa forma é necessária a busca por novas formas de tratamento, uma vez que ainda não se tem nada eficaz o suficiente para acabar com a infecção por completo.

1.6 Triagem Virtual

O método de triagem virtual veio comum uma nova forma de auxiliar na busca por novas formas de tratamento de diversos tipos de doenças. É geralmente definido como um processo em que se utiliza de grandes bibliotecas de compostos que são automaticamente avaliadas usando técnicas computacionais (JUNIOR; MIRANDA; JUNIOR, 2016). O objetivo principal de uma triagem virtual é a identificação de compostos, dentro de uma biblioteca virtual, que tenham a maior probabilidade de se ligar a um alvo biológico (BANK, 2013).

Nos últimos tempos o surgimento de softwares mais avançados e do crescimento das bibliotecas de compostos permitiu que essa técnica ganhasse um impulso adicional, visto que parte desses sistemas é encontrados de forma gratuita e de fácil utilização.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais:

- 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.

2.2. Objetivos 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. MATERIÁL E MÉTODOS

3.1. Seleção e geração de modelo baseado em forma.

Visando à triagem virtual em bibliotecas de ligantes, foi extraído o código do modelo 4XR8 na plataforma do "Protein Data Bank" (PDB). A partir disso isolou-se a sequência de aminoácidos LxxLL da proteína E6AP para a geração do modelo baseado em forma. Esta etapa foi realizada com ajuda do programa vROCS (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007).

O vROCs é um programa baseado no método de comparação de forma, com base na ideia de que as moléculas têm forma semelhantes e 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 quatro bancos de dados distintos. Dos quais 2 bancos sendo originais da "Chembridge Corporation", mais especificamente as 2 bibliotecas

DIVERSet™ EXP e CL. Além destes, foi usado também o banco de dados de moléculas provenientes de produtos naturais brasileiros (Nubbe) (PILON et al., 2017) e, por último, o banco ZINC (IRWIN et al., 2012).

Estás bibliotecas foram escolhidas por proporcionarem a mais ampla cobertura do espaço farmacofórico, chegando a mais de 10 milhões de compostos tanto nacionais quanto internacionais.

Essas bibliotecas de compostos foram submetidas ao programa FILTER do OMEGA 2.5.1.4, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (HAWKINS, PAUL C D.; SKILLMAN, A.G; WARREN, G.L.; ELLINGSON, B.A.; STAHL, 2010). Este 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 das bibliotecas filtradas por meio do FILTER foram submetidos ao programa QUACPAC 2.0.1.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (http://eyesopen.com), com o intuito de gerar compostos com cargas precisas ou pelo menos representadas de forma consistente.

O QUACPAC enumera o pKa e os tautômeros de cada composto, a fim de obter os estados de protonação corretos. Após a enumeração de pKa e tautômeros, a biblioteca de compostos foi submetida à geração de confôrmeros por meio do programa OMEGA (HAWKINS et al., 2010), o qual gera bancos de dados de multi-confôrmeros bioativos de compostos com alta velocidade e confiabilidade.

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. Pelo ROCS é possível realizar uma técnica rápida de 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 (JONES et al., 1997), 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 sílico.

A toxicidade dos compostos selecionados após a docagem foram avaliadas com auxílio do software online pkCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Este programa escora-se em assinaturas baseadas em gráficos que codificam padrões de distância entre átomos e são usados para representar a molécula pequena e para treinar modelos preditivos.

Esta etapa foi fundamental para predizer os potenciais inibidores que apresentam os parâmetros adequados para a seleção de drogas, visando à administração no organismo humano.

Este estudo analisou os seguintes parâmetros: Toxicidade AMES, Dose Máximas Tolerada – Humana, Toxicidade oral aguda em ratos (LD50), Toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL), Hepatotoxicidade, Toxicidade em *T. pyriformis.*

O teste de Toxicidade 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 (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

A dose Máxima "Tolerada – Humana" é uma estimativa do limite da dose máxima. É expressa em Log (mg/kg/dia), cujo valores iguais ou abaixo de 0,477 são considerados baixos, ou seja, a dose necessária para causar toxicidade é baixa; já valores acima de 0,477 são considerados altos (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

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 (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

A Toxicidade oral crônica representa um estudo onde é observada a menor dose na qual foi detectado um efeito adverso (LOAEL) e a maior dose na qual não aparecem efeitos

adversos (NOAEL). Para cada composto o resultado é mostrado pelo Log (mg/kg_bw/day) e a interpretação dos resultados está relacionada com a concentração do medicamento a ser produzido e a duração do tratamento (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

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 (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

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 (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Geração do modelo baseado em forma

A geração do modelo baseado em forma foi gerado a partir da sequência LxxLL., que já foi usada para tratamentos em outros tipos de câncer como os provados em nos estudos de Tints et al. (2014). Por isso a utilização de um ligante peptídico como modelo pode ser a chave para reduzir a propagação e geração dos tumores.

A avaliação das interações possibilitou, por meio da utilização do programa vROCs, a geração de um modelo baseado em forma (Figura 2). A molécula gerada possui 3 interações hidrofóbicas (esferas amarelas), 4 aceptores de hidrogênio (esferas vermelhas) e o corpo do peptídeo LxxLL.

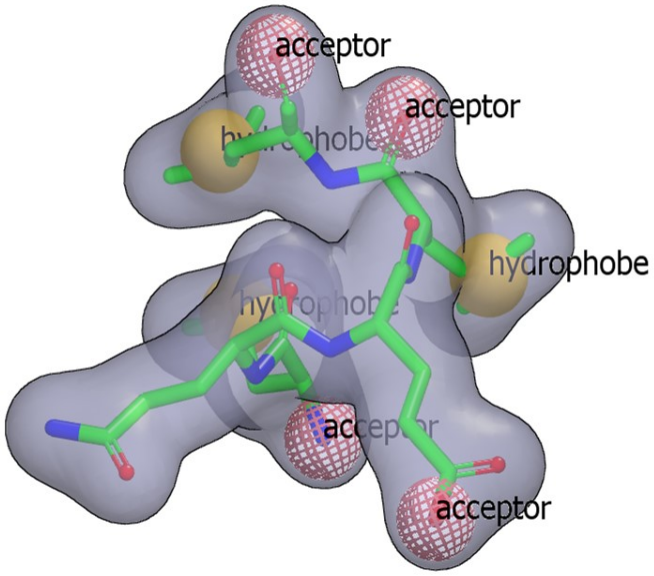

Figura 2: Modelo baseado em forma da sequência LxxLL da molécula 4XR8 por meio do programa vROCs. Os pontos em vermelho representam aceptores de elétrons e, em amarelo, as interações hidrofóbicas. Em cinza, está representado a forma (volume) do modelo e em verde o esqueleto de carbono da molécula.

Para a realização da triagem virtual, a utilização de uma biblioteca virtual de compostos químicos é uma etapa crucial para fornecer compostos com o maior grau possível de diversidade molecular, sejam eles já conhecidos e consagrados por suas atividades biológicas e terapêuticas, compostos já sintetizados e disponíveis para ensaios biológicos ou 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 para futuros ensaios biológicos. Para tanto, visando ensaios de triagem virtual, os bancos de dados de ligantes EXP, CL, NuBBE e ZINC foram escolhidos com o intuito de retirada de compostos indesejáveis e geração de tautômeros e de confôrmeros bioativos. Desta forma, as bibliotecas geradas para a triagem continham apenas compostos com características de drogas e com conformações bioativas.

4.2. Triagem virtual em banco de dados de compostos e docagem

O objetivo central da triagem virtual é o de predizer 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 (JUNIOR; MIRANDA; JUNIOR, 2016).

Os bancos de dados foram triados virtualmente através do programa vROCS, resultando nas 500 melhores moléculas para cada banco de dados. As melhores moléculas

foram ranqueadas segundo a função de pontuação TanimotoCombo, que avalia o 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. As posições de docagem de maior escore podem ser vistas nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

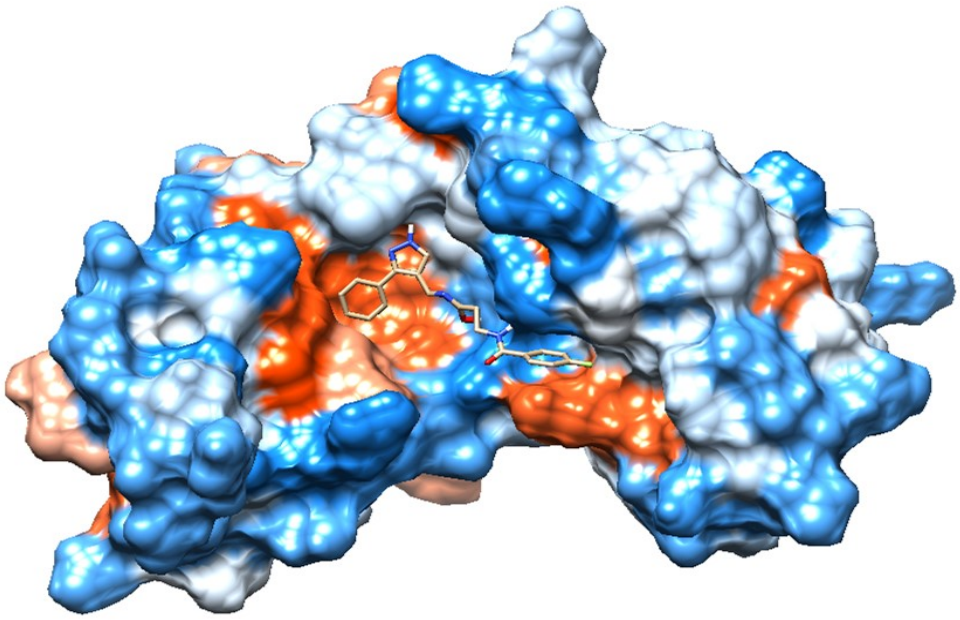

Figura 3: Representação da estrutura 3D da proteína E6 interagindo com o composto 43597 do banco de dados CL. As regiões em azul representam os aminoácidos hidrofílicos e em laranja os hidrofóbicos.

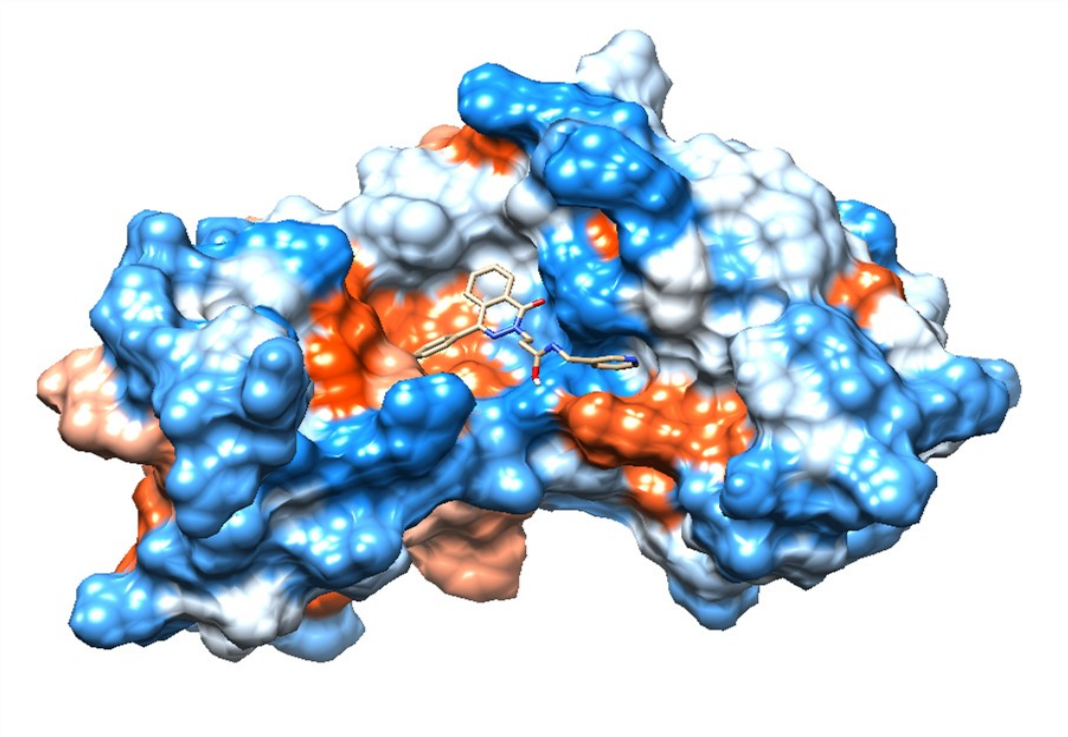

Figura 4: Representação da estrutura 3D da proteína E6 interagindo com o composto 10706 do banco de dados EXP. As regiões em azul representam os aminoácidos hidrofílicos e em laranja os hidrofóbicos.

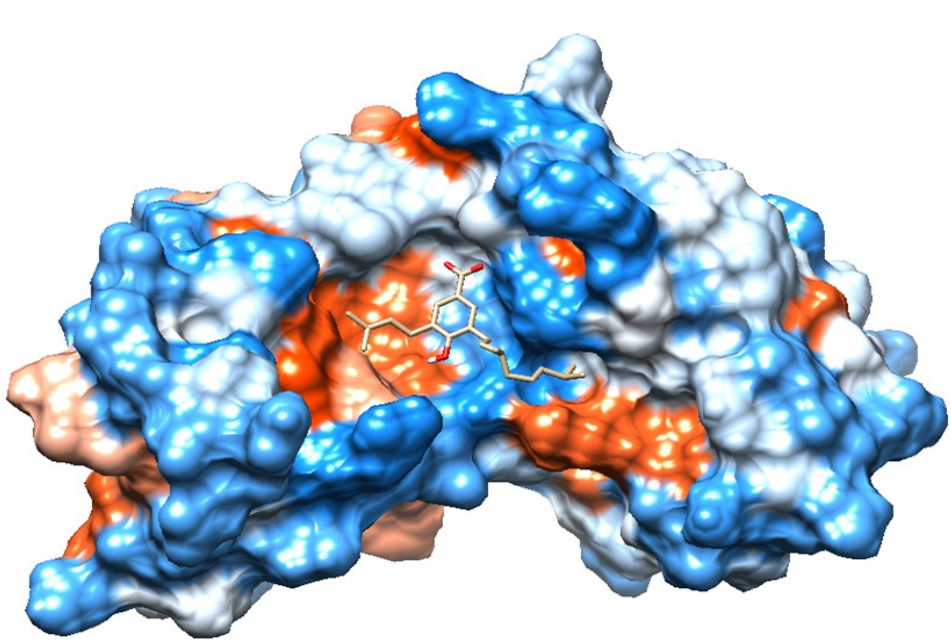

Figura 5: Representação da estrutura 3D da proteína E6 interagindo com o composto 1084 do banco de dados Nubbe. As regiões em azul representam os aminoácidos hidrofílicos e em laranja os hidrofóbicos

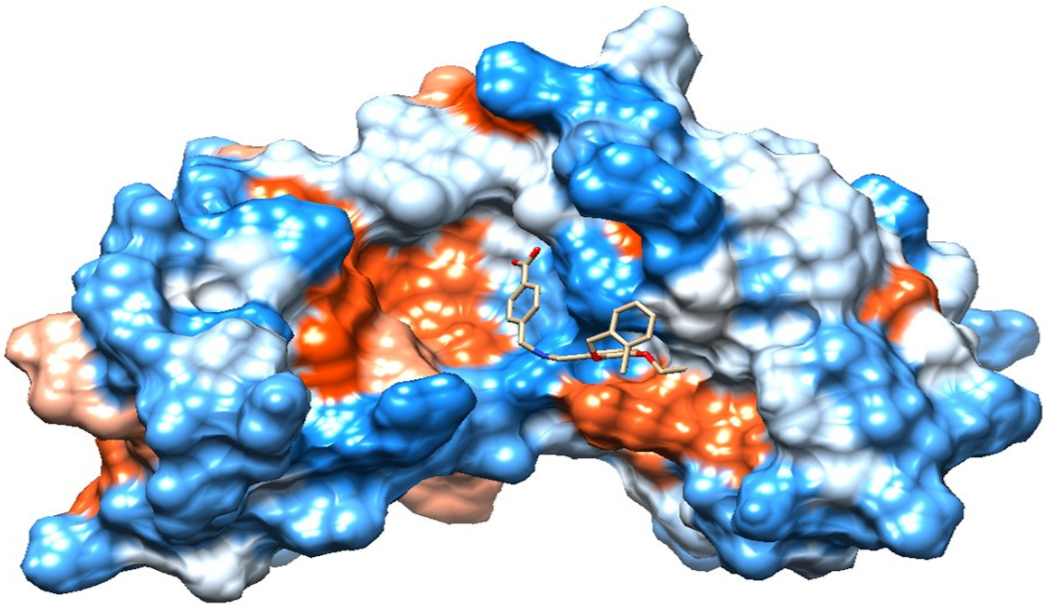

Figura 6: Representação da estrutura 3D da proteína E6 interagindo com o composto 13729795 do banco de dados ZINC. As regiões em azul representam os aminoácidos hidrofílicos e em laranja os hidrofóbicos.

4.3. Análises toxidade *in silico*

As análises *in sílico* de compostos com potencial terapêutico permitem o estudo de suas propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção, juntamente com toxicidade) e têm como vantagem: a rapidez na sua execução, o baixo custo e a capacidade de reduzir o uso de animais em ensaios de toxicidade (MACEDO, K.; MELO FILHO, C.; ANDRADE, 2013).

Nas tabelas 1, 2, 3 e 4 estão representados os resultados obtidos dos testes de toxicidade, juntamente com o escore obtido no programa GOLD para as 10 melhores moléculas de cada biblioteca. Muito embora as pontuações adquiridas no GOLD sejam altas, não significa que a molécula vá ser o ideal para se tornar um potencial ligante.

Dessa forma, os compostos 19510, 14447, 1638 e 12546923 (destacados em vermelho) foram os que apresentaram melhores resultados nas análises de toxicidade dentre as 10 melhores moléculas das bibliotecas CL, EXP, Nubbe e ZINC respectivamente.

Pode-se observar, de acordo com as tabelas, que as moléculas não apresentaram hepatotoxicidade ou toxicidade AMES, o que se torna um ponto favorável à utilização das mesmas para serem escolhidas como potenciais ligantes. Além disso, os melhores compostos

das bibliotecas Nubbe e ZINC apresentaram um valor satisfatório para dose máxima tolerada em humanos.

Código do Ligante	**43597**	**14193**	**46838**	**38231**	**19510**	**993**	**15806**	**7178**	**28487**	**31344**
Escore GOLD	81,085	80,075	79,629	78,091	**77,615**	77,537	75,594	75,366	75,344	75,255
Toxicidade AMES	Não	Não	Não	Não	**Não**	Não	Não	Não	Sim	Não
Dose Máxima Tolerada	0,321	-0,223	0,146	0,130	**-0,162**	-0,082	-0,238	-0,607	0,329	0,711
Toxicidade oral aguda	2,199	2,616	2,825	2,474	**1,877**	2,494	2,141	2,637	2,352	2,313
Toxicidade oral Crônica	1,071	1,257	1,003	1,890	**1,079**	1,949	1,36	2,054	2,813	1,078
Hepatotoxicidade	Sim	Sim	Sim	Sim	**Não**	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Toxicidade em *T.pyriformis*	0,740	0,323	0,591	0,361	**0,653**	0,467	0,422	0,482	0,285	0,392

Tabela 1: Valores das predições de toxicidade dos 10 melhores ligantes do banco de dados CL, gerados pelo servidos pkCSM Pharmacokinetics.

Código do Ligante	**10706**	**12450**	**9774**	**12237**	**12450**	**34253**	**14447**	**34557**	**18060**	**9197**
Escore GOLD	81.3179	81.2339	80.1050	79.1529	77.6426	76.8411	**76.2789**	76.1678	76.1266	75.9701
Toxicidade AMES	Não	Não	Não	Não	Não	Não	**Não**	Não	Não	Sim
Dose Máxima Tolerada	0,444	0,152	-0,205	0,663	0,427	-0,126	**-0,023**	-0,180	0,444	0,831
Toxicidade oral aguda	2,299	2,523	2,573	2,537	2,551	2,285	**2,548**	2,11	2,299	2,478
Toxicidade oral Crônica	1,823	1,851	1,015	0,374	1,112	1,607	**0,659**	1,748	1,823	1,455
Hepatotoxicidade	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	**Não**	Sim	Sim	Sim
Toxicidade em *T. pyriformis*	1,258	1,561	0,286	0,295	0,321	0,351	**0,316**	0,300	1,258	0,496

Tabela 2: Valores das predições de toxicidade dos 10 melhores ligantes do banco de dados EXP, gerados pelo servidos pkCSM Pharmacokinetics.

Código do Ligante	**1084**	**1605**	**198**	**1651**	**1638**	**1630**	**859**	**2472**	**1858**	**1650**
Escore	87,177	83,089	81,809	81,300	**79,903**	78,771	77,823	77,434	77,301	76,926
Toxicidade AMES	Não	Não	Não	Não	**Não**	Não	Não	Não	Não	Não
Dose Máxima Tolerada	0,505	0,079	0,314	0,482	**0,559**	0,580	0,416	0,603	-0,363	0,342
Toxicidade oral aguda	2,230	2,311	2,221	2,106	**1,948**	2,303	2,94	2,024	1,929	2,512
Toxicidade oral Crônica	1,490	2,199	1,914	2,095	**2,511**	1,803	1,518	2,047	2,054	1,521
Hepatotoxicidade	Não	Sim	Sim	Não	**Não**	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade em *T. pyriformis*	0,331	0,285	0,288	0,949	**1,312**	0,769	0,285	1,675	1,173	0,308

Tabela 3: Valores das predições de toxicidade dos 10 melhores ligantes do banco de dados Nubbe, gerados pelo servidos pkCSM Pharmacokinetics.

Código do Ligante	**13729795**	**8399683**	**32736439**	**48325340**	**12546923**	**20805884**	**1329305**	**59016129**	**2739307**	**14995453**
Escore	91.125	88.976	88.555	88.396	**87.172**	86.566	84.446	83.004	80.840	80.812
Toxicidade AMES	Não	Sim	Não	Não	**Não**	Não	Não	Não	Não	Não
Dose Máxima Tolerada	0,400	0,490	0,281	0,068	**0,662**	-0,267	0,360	0,919	0,684	0,217
Toxicidade oral aguda	2,682	2,722	2,378	1,828	**2,583**	3,083	2,297	3,209	2,440	2,915
Toxicidade oral Crônica	1,428	0,154	2,416	2,131	**1,215**	-0,163	1,021	1,151	0,801	3,006
Hepatotoxicidade	Sim	Sim	Sim	Sim	**Não**	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Toxicidade em *T. pyriformis*	0,288	0,285	0,285	0,291	**0,285**	0,310	0,331	0,286	0,291	0,287

Tabela 4: Valores das predições de toxicidade dos 10 melhores ligantes do banco de dados ZINC, gerados pelo servidos pkCSM Pharmacokinetics.

4.4. Geração de diagramas da interação 2D proteína-ligante

A partir das análises das predições de toxicidade o programa GOLD foi usado para gerar um diagrama 2D da interação da proteína E6 com a molécula com o melhor resultado para se tornar um potencial ligante, mostrado nas figuras 7, 8, 9 e 10.

De acordo com os resultados obtidos os códigos do melhor composto de cada biblioteca foram: 19510 da biblioteca CL, 14447 da EXP, 1638 da Nubbe e 12546923 do ZINC. O diagrama mostrou que tais compostos apresentaram pelo menos uma ligação de hidrogênio diante da interação com a proteína E6, além de diversas interações hidrofóbicas e força de vander Waals.

Contudo, a molécula 19510 da biblioteca CL destacou-se por apresentar uma maior quantidade de ligações de hidrogênio, o que leva a uma maior estabilidade da molécula na interação.

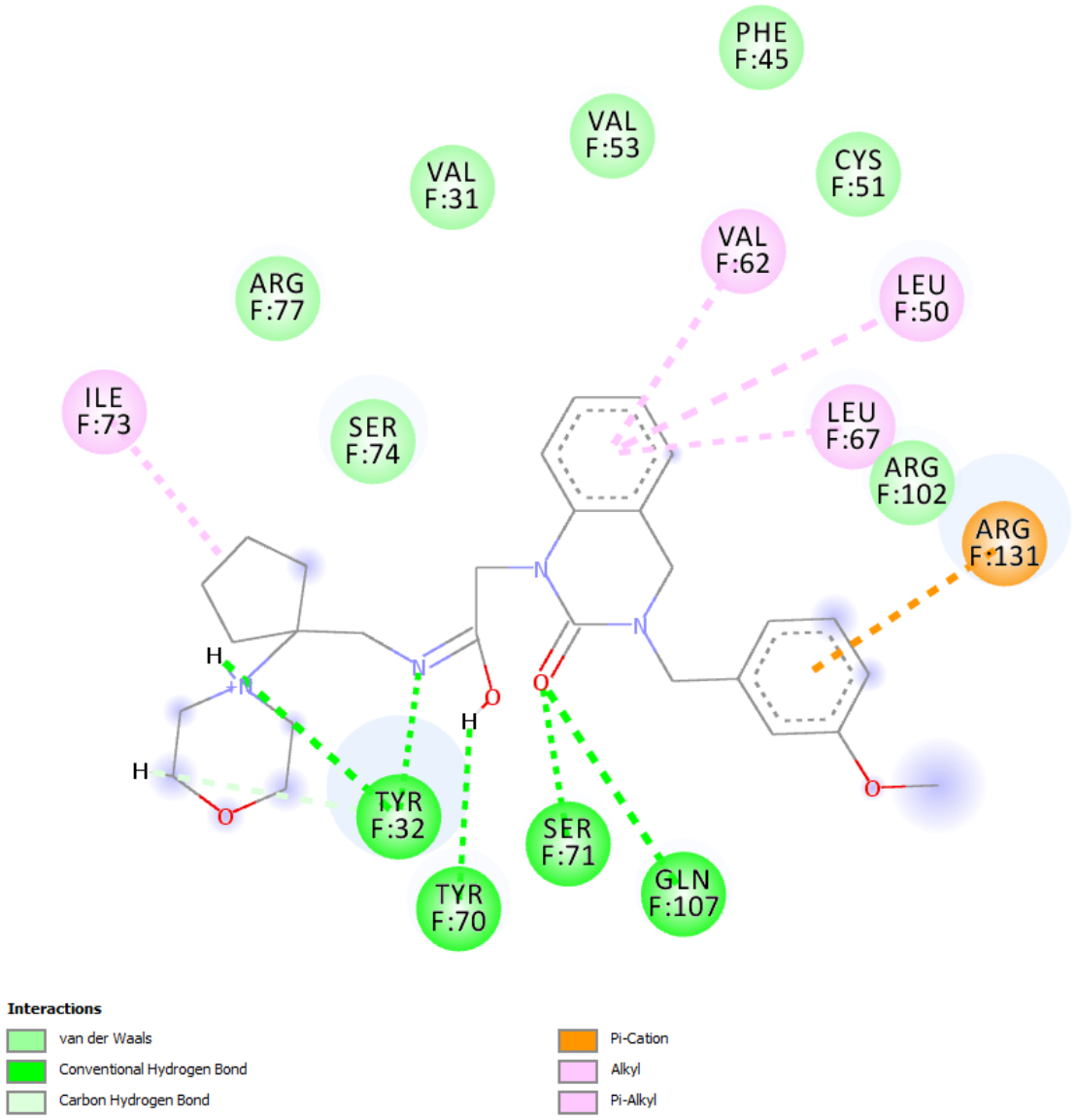

Figura 7: Interação do ligante 19510 extraído do banco de dados CL. As interações representadas pelo verde mais claro são as forças de van der Waals, enquanto que as com verde escuro representam ligações de hidrogênio. Ademais, as ligações representadas pelas cores laranja e rosa são interações hidrofóbicas.

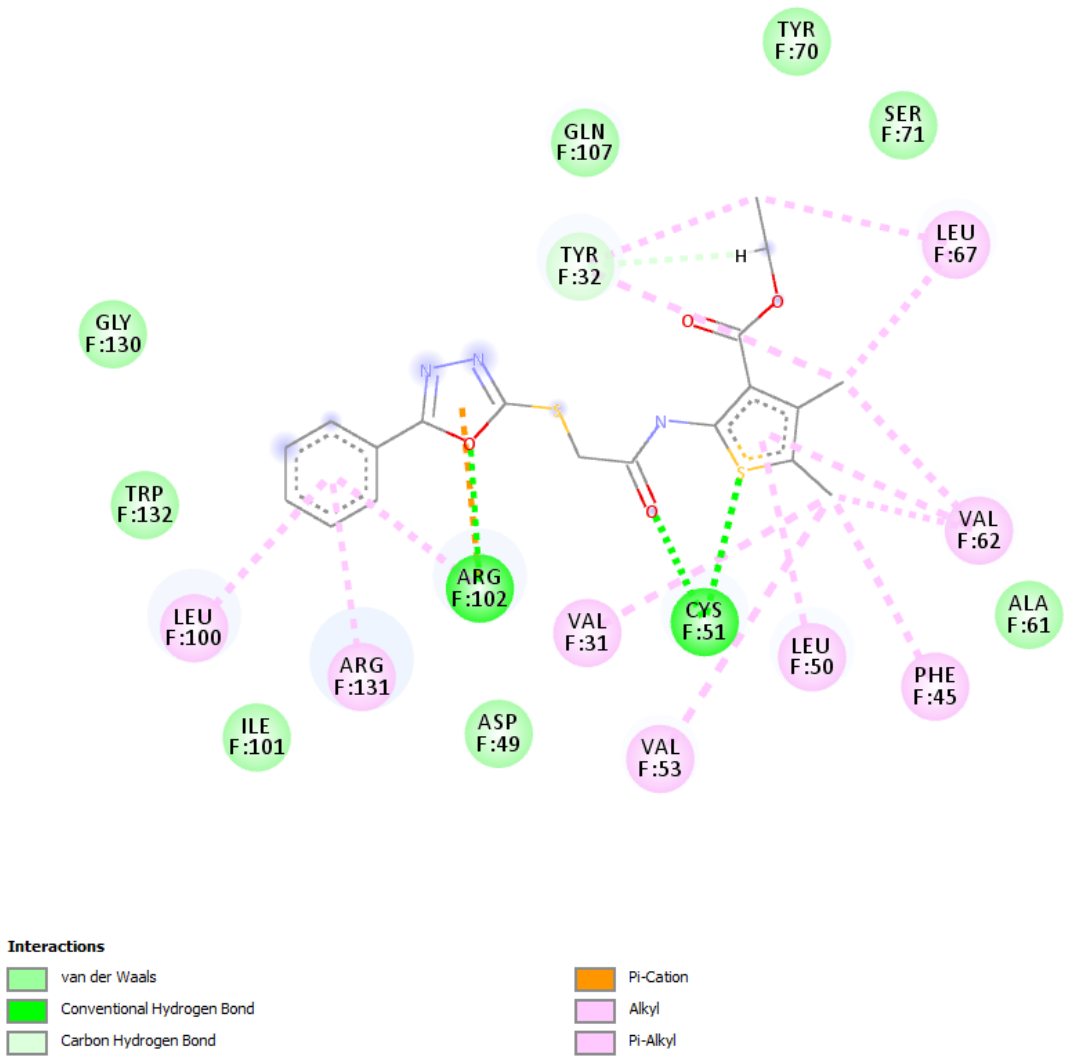

Figura 8: Interação do ligante 14447 extraído do banco de dados EXP. As interações representadas pelo verde mais claro são as forças de van der Waals, enquanto que as com verde escuro representam ligações de hidrogênio. Ademais, as ligações representadas pela cor rosa são interações hidrofóbicas.

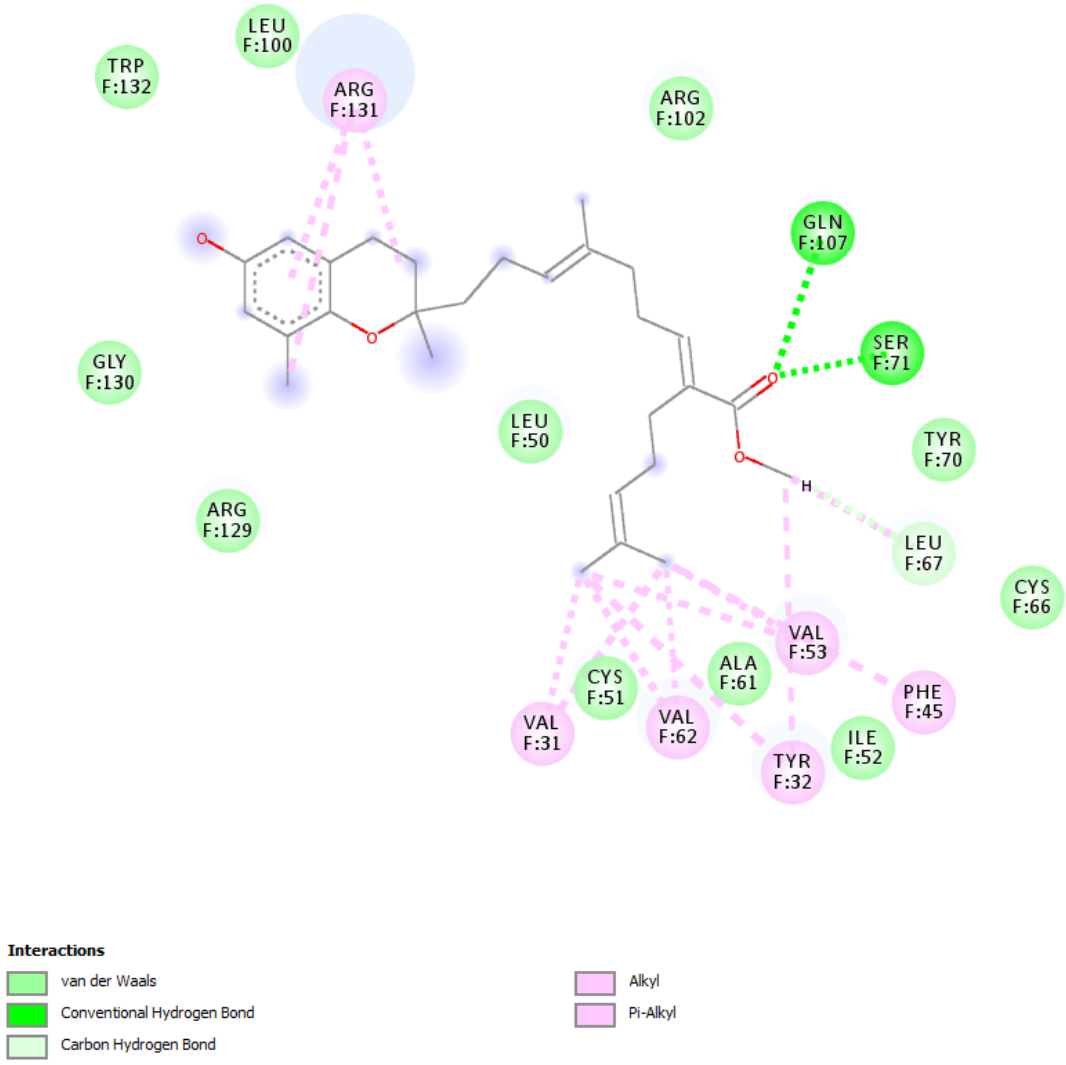

Figura 9: Interação do ligante 1638 extraído do banco de dados Nubbe. As interações representadas pelo verde mais claro são as forças de van der Waals, enquanto que as com verde escuro representam ligações de hidrogênio. Ademais, as ligações representadas pela cor rosa são interações hidrofóbicas.

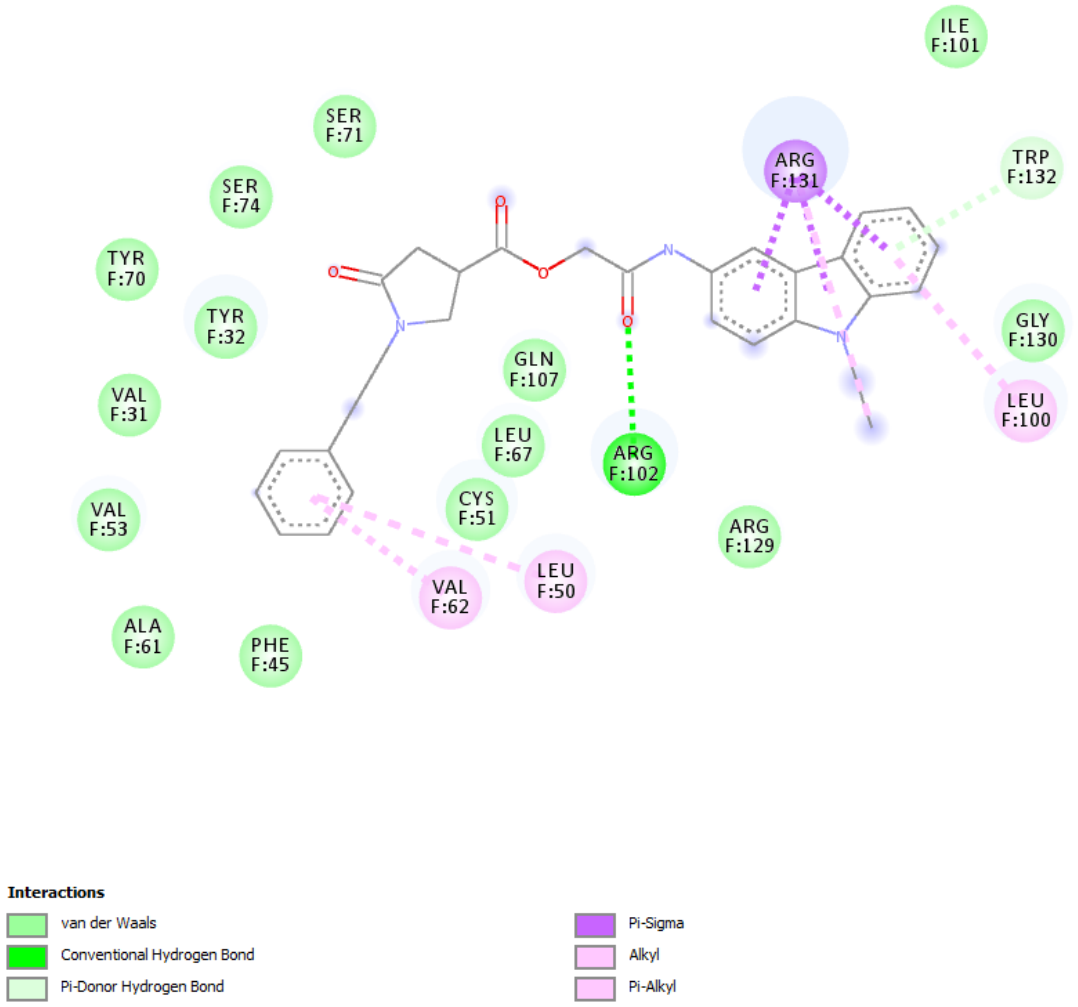

Figura 10: Interação do ligante 12546923 extraído do banco de dados ZINC. As interações representadas pelo verde mais claro são as forças de van der Waals, enquanto que as com verde escuro representam ligações de hidrogênio. Ademais, as ligações representadas pela cor rosa são interações hidrofóbicas.

É importante ressaltar a existência das ligações de hidrogênio, uma vez que está relacionada com o maior potencial de estabilidade da ligação 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 com maior índice de eletronegatividade (exemplos: Oxigênio, Nitrogênio e Flúor) e um átomo ou grupo funcional na mesma molécula ou em uma molécula adjacente (OLIVEIRA, 2007).

Além disso, estas interações são responsáveis pela manutenção das conformações bioatívas de proteínas (α-hélices e folhas β) e estão relacionadas com as propriedades físico químicas da água. Os termos que mais contribuem energeticamente para a sua estabilidade são: a energia eletrostática e a baixa energia de repulsão.

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.

A triagem virtual já provou ser eficaz em identificar possíveis inibidores para a reprodução viral, como mostram as pesquisas de Li et al. (2010) e Chandra et al. (2011), as quais foram capazes de demonstrar um possível inibidor para o vírus Epstein-Barr, causador da mononucleose infeciosa, de forma a dar início à busca para uma nova forma de tratamento da doença com a utilização de produtos naturais.

Quando falamos ainda em triagem virtual e HPV, pode-se citar as pesquisas de Pennisi et al. (2017) e Kumar et al. (2016) as quais testaram possíveis inibidores para o vírus do papiloma humano comparando as previsões feitas em testes *in silico* com os testes *in vivo*.

Até o momento não existe um tratamento totalmente eficaz contra o vírus do HPV, somado ao fato de que os existentes não demonstram serem comprovadamente capazes de erradicar o vírus. Desta forma, a utilização de 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.

Para que um composto seja considerado um fármaco é preciso que apresente características que o torne apto a ser administrado em pacientes. Dessa forma, através da triagem virtual, tem-se a possibilidade de se testar um vasto número de compostos com o intuito de encontrar uma molécula capaz de se tornar um fármaco.

O método realizado neste trabalho se mostrou útil com relação à exclusão de compostos que se mostraram tóxicos ou mutagênicos durante o processo inicial de

identificação. Os resultados mostraram quatro possíveis potenciais ligantes para a estrutura tridimensional da proteína E6 do HPV.

Por fim, é inevitável concluir que ainda há um longo caminho entre os testes mostrados pelo presente trabalho e a produção de novos fármacos. Porém, a triagem virtual demonstrou ser uma ferramenta importante na descoberta de novos medicamentos e possui grande potencial para substituir diversos experimentos mais onerosos e menos eficazes existentes hoje em dia.

6. REFERÊNCIAS

BANK, P. D. Triagem virtual e avaliação in silico de potenciais inibidores da NS5 metiltransferase do vírus da dengue. p. 38–41, 2013.

BEAUDENON, S.; HUIBREGTSE, J. M. HPV E6 , E6AP and cervical cancer. v. 7, p. 1–7, 2008.

BORSATTO, A. Z. et al. Vacina contra o HPV e a Prevenção do Câncer do Colo do Útero : Subsídios para a Prática HPV Vaccine and the Prevention of Cervical Uterus Cancer : Subsidies to the Practice. v. 57, n. 1, p. 67–74, 2011.

BRUNI, L.; ALBERTO, G.; SERRANO, B.; MENA, M. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. **ICO/IARC HPV information Centre**, n. June, p. 1–303, 2019.

BZHALAVA, D.; EKLUND, C.; DILLNER, J. International standardization and classi fi cation of human papillomavirus types. **Virology**, v. 476, p. 341–344, 2015.

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

CHANDRA, N. et al. Virtual screening , identification and experimental testing of novel inhibitors of PBEF1 / Visfatin / NMPRTase for glioma therapy. p. 1–12, 2011.

FARAH, F. P.; MENDES, F. G. Vacina como agente de imunização contra o HPV Vaccines as an agent for immunization against HPV. p. 3799–3808, 2014.

GARBUGLIA, A. R. Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer. p. 1705–1726, 2014.

HAWKINS, PAUL C D.; SKILLMAN, A.G; WARREN, G.L.; ELLINGSON, B.A.; STAHL, M. T. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and the Cambridge Structural Database. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 50, p. 572–584, 2010.

HAWKINS, P. C. D. et al. Conformer Generation with OMEGA : Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. v. 11, p. 572–584, 2010.

HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A. Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. p. 74–82, 2007.

IRWIN, J. J. et al. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. 2012.

JONES, G. et al. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. p. 727–748, 1997.

JUNIOR, S.; MIRANDA, T. F. N.; JUNIOR, M. C. S. Artigo Identificação de

Potenciais Inibidores da Beta-Cetoacil Sintase do Mycobacterium tuberculosis por Triagem Virtual inhibitors by virtual screening Revista Virtual de Química Identificação de Potenciais Inibidores da Beta-Cetoacil Sintase do Mycobact. v. XX, n. Xx, 2016.

KUMAR, S. et al. The in Silico Approach to Identify a Unique Plant-Derived Inhibitor Against E6 and E7 Oncogenic Proteins of High-Risk Human Papillomavirus 16 and 18. v. 4, n. 1, p. 4–8, 2016.

LI, N. et al. Discovery of Selective Inhibitors Against EBNA1 via High Throughput In Silico Virtual Screening. v. 5, n. 4, 2010.

LOKE, A. Y. et al. 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**, p. 1–13, 2017.

MACEDO, K.; MELO FILHO, C.; ANDRADE, C. Avaliação in silico da toxicidade de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 10, p. 1, 2013.

MARTINEZ-ZAPIEN, D. et al. HHS Public Access. v. 529, n. 7587, p. 541–545, 2016.

MUMM, K. et al. Identification of several high-risk HPV inhibitors and drug targets with a novel high-throughput screening assay. p. 1–27, 2017.

OLIVEIRA, B. G. Artigo. v. 30, n. 4, p. 791–796, 2007.

PENNISI, M. et al. Combining agent based-models and virtual screening techniques to predict the best citrus-derived vaccine adjuvants against human papilloma virus. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. Suppl 16, 2017.

PILON, A. C. et al. NuBBE DB : an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, n. April, p. 1–12, 2017.

PIRES, D. E. V; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. 2015.

SAKAI, H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. v. 3, n. April, p. 1–12, 2012.

SIDDIQA, A. et al. Diverse Papillomavirus Types Induce Endosomal Tubulation. v. 9, n. May, p. 1–9, 2019.

SOUTO, R. O Papilomavírus Humano : um fator relacionado com a formação de neoplasias. v. 51, n. 2, p. 155–160, [s.d.].

TINTS, K. et al. LXXLL Peptide Converts Transportan 10 to a Potent Inducer of Apoptosis in Breast Cancer Cells. p. 5680–5698, 2014.