Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

ANÁLISE IN SILICO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO ONCOGENE E5 DO HPV 16

IN SILICO ANALYSIS OF THE GENETIC VARIABILITY OF ONCOGENE E5 HPV 16

Gabriella Amâncio Matos[1]
Maria do Carmo Andrade Duarte de Farias[2]
Antônio Humberto Pereira da Silva Junior[3]

RESUMO - Introdução: O Papilomavírus humano (HPV) é o responsável por causar diversos tipos de cânceres, destacando-se o cervical, e as lesões genitais, sendo o oncogene E5 pertencente a esse patógeno importante para seu potencial oncogênico. **Objetivo:** Analisar a variabilidade genética in silico do gene E5 das sequências gênicas do HPV 16. **Método:** Trata-se de um estudo descritivo, quanti-qualitativo, ao apresentar o mapeamento e quantificar as regiões polimórficas do gene E5. Para a coleta das sequencias gênicas, foi utilizado o banco de dados genômicos do National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências gênicas foram coletadas no formato FASTA. Posteriormente, foi utilizado o programa CLUSTALW, do pacote de dados do software MEGA6, para a realização do alinhamento múltiplo das sequências, permitindo a identificação de sítios polimórficos entre duas ou mais sequências gênicas. **Resultados:** As análises das variações do oncogene E5 do HPV16 revelaram a existência de vários sítios polimórficos, bem como as variações encontradas nas sequencias das variantes, em relação à sequência protótipo K02718. Em relação ao mapeamento dos epítopos foi observado que a sequência da oncoproteína 16E5 da amostra de referência K02718, formou epítopos imunogênicos com moléculas pertencentes ao MHC-I (HLA-A e HLA-B) e MHC-II (HLADR), sendo as moléculas

[1] Bacharel em Medicina pela UFCG; Residente de Cirurgia Geral pela ESP-CE – Hospital Waldemar Alcântara. E-mail: amancio.gabi@gmail.com
[2] Professora Titular da UFCG; Doutora em Enfermagem; Pós-doutorado em Ciências da Saúde – FMABC-Santo André, SP. E-mail: maria.andrade@professor.ufcg.edu.br
[3] Bacharelado em Ciências Biológicas (2002), Mestrado em Genética (2005) e Doutorado (2018) pelo Programa de Pós-Graduação em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: antoniohumbertojr@yahoo.com.br

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

complexo HLA-A estão mais relacionadas com a ação da oncorproteína 16E5. **Conclusões:** O estudo dos epítopos imunogênicos é útil para o planejamento da identificação de progressões carcinogênicas precoces, sendo a biologia computacional uma nova vertente de estudo científico para identificação e ação inicial para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas.

Palavras-chave: Papilomavírus Humano 16; Oncogene; Neoplasias do Colo Uterino.

ABSTRACT - Introduction: The human papillomavirus (HPV) is responsible for causing several types of cancer, especially cervical and genital lesions, and the E5 oncogene belonging to this pathogen is important for its oncogenic potential. **Objective:** To analyze the in silico genetic variability of the E5 gene of the HPV 16 gene sequences. **Method:** This is a descriptive, quantitative-qualitative study, presenting the mapping and quantifying the polymorphic regions of the E5 gene. For the collection of gene sequences, the genomic database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) was used. Gene sequences were collected in FASTA format. Subsequently, the CLUSTALW program, from the MEGA6 software data package, was used to perform the multiple alignment of the sequences, allowing the identification of polymorphic sites between two or more gene sequences. **Results:** The analysis of the variations of the E5 oncogene of HPV16 revealed the existence of several polymorphic sites, as well as the variations found in the sequences of the variants, in relation to the prototype sequence K02718. Regarding the epitope mapping, it was observed that the sequence of the oncoprotein 16E5 of the reference sample K02718, formed immunogenic epitopes with molecules belonging to MHC-I (HLA-A and HLA-B) and MHC-II (HLADR), being the molecules HLA-A complex are more related to the action of the 16E5 oncoprotein. **Conclusions**: The study of immunogenic epitopes is useful for planning the identification of early carcinogenic progressions, and computational biology is a new strand of scientific study for identification and initial action for the development of immunotherapeutic strategies.

Keywords: Human Papillomavirus 16; Oncogene; Cervical Neoplasms.

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) é responsável por causar o câncer cervical, o qual afeta um elevado número de mulheres jovens. Além deste, o HPV também está correlacionado com o desenvolvimento de outros tipos: o câncer na vagina, pênis, vulva e ânus. Os genótipos do HPV são divididos em duas categorias: HPV de alto risco (High Risk HPV (HR-HPV)) e o HPV de baixo risco (Low Risk HPV (LR-HPV)). Esta classificação é dada de acordo com a capacidade oncogênica do genótipo. Em geral, os LR-HPVs são responsáveis pelo aparecimento de verrugas genitais, enquanto os HR-HPVs estão associados às mudanças celulares anormais que progridem para o câncer (CECCARELLI *et al*., 2018).

Os genótipos HPV16 e HPV18 são considerados de alto risco oncogênico, amplamente distribuídos ao redor do mundo, contribuindo com mais de 70% dos casos de câncer cervical. Destes, o HPV16 é o genótipo com maior disseminação na população mundial (ZHANG *et al*., 2017). Neste contexto, o estudo das variantes do HPV16 tem possibilitado a identificação de novos polimorfismos, denominados SNP (single-nucleotide polymorphisms). Esta identificação molecular perme identificar as linhagens e sublinhagens do HPV16 com maior persistência no processo infeccioso e com maior predisposição ao desenvolvimento de lesões que culminem com o estabelecimento do processo carcinogênico cervical (BURK *et al*., 2013). O gene E5 e sua oncoproteína vem sendo estudados pela sua relação com o processo de carcinogênese mediada pelo HPV. Ele estimula a proliferação celular, através da ativação dos receptores para o fator de crescimento epitelial (EGFR), e nas etapas de iniciação da carcinogênese, além de interagir com moléculas do sistema imune (DOORBAR *et al*., 2013).

Assim, a identificação dos principais genótipos circulantes numa população, bem como o entendimento das suas variações genéticas, tem sido objeto de análise por diversos grupos de pesquisa. A partir das análises filogenéticas e com a determinação de similaridades 16 entre as linhagens dos HPV circulantes, podemos identificar o desenvolvimento e a prospecção de novas espécies de HPV, cujo o estudo genético das linhagens e das sublinhagens, podem ser úteis para o desenvolvimento de novas estratégias imunoterapêuticas. Como pergunta de partida que norteou este trabalho indagou-se: qual a variabilidade genética descrita para o oncogene E5 do HPV16 nas bases genômicas? A hipótese aventada é de estejam descritas variáveis genômicas que, mesmo em pequena quantidade, face a dificuldade de pesquisa desta região genômica e

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

seu produto, contribuem com a infectividade do HPV. O objetivo desse trabalho é analisar, in silico, a variabilidade genética do oncogene E5 do HPV16, das sequências gênicas depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), a fim de identificar os sítios polimórficos na oncoproteína E5, analisar os potenciais efeitos desta heterogeneidade genética no processo infeccioso, identificar possíveis epítopos imunogênicos com os alelos da classe MHC-I e MHC-II.

MÉTODO

Trata-se de um estudo descritivo, de natureza quanti-qualitativa, ao apresentar o mapeamento e quantificar as regiões polimórficas do gene E5. Os dados coletados são de natureza secundária, pois são provenientes de bancos de dados genômicos, disponíveis para o acesso da comunidade científica. Num banco de dados genômico "as sequências de DNA e RNA são normalmente apresentadas juntamente com outras informações como o organismo a qual a sequência pertence ou ainda com as funções fisiológicas relacionadas à sequência" (KRÖGER, 2001, p. 30).

Para a coleta das sequencias gênicas foi utilizado o banco de dados genômicos do National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências coletadas para o HPV16 foram: K02718 (sequência de referência, A1), AF536179 (A2), HQ644236 (A3), AF534061 (A4), AF536180 (B1), HQ644298 (B2), AF472509 (C), HQ644257 (D1), AY686579 (D2) e AF402678 (D3). As sequências utilizadas neste estudo, bem como a sua padronização filogenética, estão disponíveis em Burk *et al*., 2013.

As sequências gênicas foram coletadas no formato FASTA. Posteriormente, foi utilizado o programa CLUSTALW, do pacote de dados do software MEGA6, para a realização do alinhamento múltiplo das sequências (TAMURA *et al*., 2011). Esta análise permite a identificação de sítios polimórficos entre duas ou mais sequências gênicas. Após a identificação de sítios polimórficos e a sua devida anotação, foi realizado o alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da oncoproteína 16E5. Esta etapa permitiu identificar mudanças estruturais na organização da estrutura secundária da oncoproteína, a partir do alinhamento dos códons.

Após a obtenção da sequência de aminoácidos da oncoproteína E5 foi utilizado o servidor on line Psipred, para a predição da estrutura secundária da oncoproteína. Este servidor incorpora diferentes métodos de análise (PSIPRED, GenTHREADER e

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

MEMSAT 2) e de predição estrutural da sequência de aminoácidos de uma proteína (MCGUFFIN *et al*., 2000), possibilitando a geração de uma estrutura secundária mais robusta em relação a outros métodos computacionais (ver apêndice A).

Neste estudo, as sequências que foram analisadas da oncoproteína 16E5 foram derivadas da análise de sequencias da oncoproteína E5, depositadas no banco de dados do NCBI e, posteriormente, analisadas no software PSIPRED, com o objetivo de investigar a estrutura secundária da proteína, bem como as variações encontradas nas sequencias das variantes, em relação à sequência protótipo K02718. O software PSIPRED disponibiliza uma acurácia dos resultados obtidos com a análise das sequências das variantes estudadas, permitindo gerar dados mais robustos sobre a estrutura e a topologia destas proteínas transmembranares (ver apêndice A).

Para a identificação de possíveis epítopos imunogênicos foi utilizado o servidor online Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) (http://www.iedb.org/), o qual representa uma plataforma on line que reúne diferentes métodos de análise e identificação de epítopos imunogênicos. Foi utilizado a sequência de referência K02718 (A1), para o mapeamento dos potenciais epítopos imunogênicos, com moléculas pertencentes aos alelos de MHC-I e MHCII. Para o MHC-I, a análise dos epítopos seguiu o padrão de set de alelos do servidor, que reúne os alelos mais frequentes e distribuídos na população mundial, comprimento da sequência do epítopo (que variou entre 9-10mer), classificação dos epítopos de acordo com o percentile rank 0,5. Estes critérios de seleção dão suporte à identificação de potentes epítopos imunogênicos. Na identificação de potenciais epítopos para as moléculas do MHC-II, novos critérios foram incluídos, como a análise do percentile value e o IC50 value.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene E5 atua em diversas etapas do processo carcinogênico, afetando e desregulando diversas moléculas. De acordo com diversos estudos, há a possibilidade de se utilizar a E5 como alvo na terapia de câncer cervical, assim como as vias alteradas por essa proteína. Por se tratar de uma proteína expressa em estágios iniciais da infecção e das lesões, possui potencial terapia contra a infecção pelo HPV e lesões pré-cancerosas, prevenindo contra a progressão para o câncer invasivo (VENUTI *et al*., 2011).

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

As variantes do oncogene E5 do HPV16 circulantes na população mundial são classificadas, atualmente, nas linhagens A, B, C e D e nas suas respectivas sublinhagens A1 (European, E), A2 (European, E), A3 (European, E), A4 (Asian, E (As)), B1 (African-1, Afr1a), B2 (African-1, Afr1b), C (African-2, Afr2a), D1 (North American (NA)1), D2 (Asian-American (AA)2) e D3 (Asian-American (AA)1), sendo a sublinhagem A1 denominada a sequência de referência. As análises das variações do oncogene E5 do HPV16 depositadas nos bancos de dados, revelaram a existência de vários sítios polimórficos (Tabela 1).

Tabela 1 – Variações nucleotídicas do oncogene E5 do HPV16

Isolados	Posição dos Sítios Polimórficos													Variante	Sublinhagem
	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4		
	8	8	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0		
	5	6	6	7	9	1	3	4	4	4	5	7	8		
	8	8	7	9	1	7	4	2	3	9	9	7	9		
Referência K02718	T	G	A	A	C	G	T	A	T	T	A	A	T	A	A1
AF536179	*	*	*	C	*	*	G	*	*	G	*	*	*	A	A2
HQ644236	*	*	*	C	G	*	*	G	*	*	*	*	*	A	A3
AF534061	*	*	*	C	*	*	G	G	G	*	*	T	*	A	A4
AF536180	C	A	*	C	T	*	*	T	*	*	*	*	C	B	B1
HQ644298	C	A	*	C	T	*	*	T	*	*	*	*	C	B	B2
AF472509	C	*	*	C	G	*	*	G	*	*	C	*	C	C	C1
HQ644257	C	*	*	C	T	A	*	G	*	*	*	*	C	D	D1
AY686579	C	*	G	C	G	A	*	G	*	*	*	*	C	D	D2
AF402678	C	*	*	C	G	A	*	G	*	*	*	*	C	D	D3

* Nucleotídeos conservados em relação a sequência de referência K02718 estão marcados com asterisco.
Fonte: Elaborada pelo autor por meio dos dados do programa CLUSTALW e MEGA6.

Os resultados apresentados na tabela 1 apontam para a identificação de um número total de 13 sítios mutacionais, obtidos a partir do alinhamento múltiplo das 10 amostras variantes de 16E5 depositadas no NCBI, sendo a sublinhagem D2 a mais polimórfica.

No Brasil, o HPV16 é um dos tipos virais com ampla distribuição nas diversas regiões do País, em especial na região Nordeste (CHAGAS *et al.*, 2011, 2013;

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

GURGEL *et al*., 2015). Inúmeras variantes do HPV16 foram identificadas em diferentes localidades e grupos étnicos ao redor do mundo, e exibe diferentes potenciais oncogênicos, indicando que algumas linhagens específicas podem afetar a persistência da infecção pelo HPV e a progressão das lesões precursoras do câncer cervical (LI *et al*., 2011; SUN *et al*., 2013). Estas variantes do HPV16 diferem na prevalência e nas propriedades bioquímicas e biológicas, com implicações incertas na etiologia do câncer do colo do útero (PLEASA *et al*., 2014). No entanto, a distribuição de variantes do oncogene 16E5, no Brasil, é pouco avaliada.

No Nordeste do Brasil, estudo anteriores identificaram a circulação de variantes do oncogene E5 pertencentes às linhagens A (linhagem europeia) e D (linhagem não-europeia) do HPV16 (CHAGAS *et al*., 2011, 2013). De um modo geral, as variantes do HPV16 apresentam diferentes efeitos distintos, no que tange à sua patogenecidade, sendo observado mudanças na taxa de replicação celular, além de modificações na transcrição de alguns genes, como aqueles relacionados à apoptose. Este cenário contribui com a eficiência, persistência e a progressão da infecção viral (BERNARD *et al*., 2010; SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2010; FREITAS *et al*., 2012; BURK *et al*., 2013).

Outros estudos apontam para o impacto dos polimorfismos presentes nas linhagens não-europeias (B, C e D). Nestas, foi identificado um maior potencial carcinogênico, em relação aos polimorfismos identificados em variantes da linhagem europeia (A) (SCHIFFMAN *et al*., 2010; SMITH *et al*., 2011).

Em HPV16 a oncoproteína E5 é uma proteína transmembrana do tipo α-hélice, de caráter hidrofóbica e constituída por um total de 83 aminoácidos. De acordo com Saavedra *et al*. (2012), na estrutura secundária do oncogene E5 do HPV16, representada pela sequência de referência K02718, são distinguíveis três regiões importantes para o funcionamento desta oncoproteína: (1) região localizada entre os aminoácidos 1 e 30, responsável pela localização celular e ancoragem independente de crescimento, (2) região localizada entre os aminoácidos 41 e 54 e (3) região localizada entre os aminoácidos 54 ao 78, ambas contendo domínios de ligação da subunidade da bomba de prótons ATPase-16 kDa, responsável pela acidificação dos endossomos.

Em relação a predição dos epítopos para os alelos MHC-I e MHC-II está evidente que a diversidade dos alelos MHC é variável entre os inúmeros grupos étnicos, o que também é percebido pela resposta imune, de acordo com a diversidade genotípica encontrada entre as variantes de HPV16. De acordo com o mapeamento dos epítopos realizado, mediante o uso dos padrões estabelecidos na plataforma IEDB, foi observado

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

que a sequência da oncoproteína 16E5 da amostra de referência K02718, formou epítopos imunogênicos com moléculas pertencentes ao MHC-I (HLA-A e HLA-B) e MHC-II (HLA-DR).

Para o MHC-I o principal método escolhido pela plataforma foi o método Consensus (ann/smm) e os principais epítopos estão mapeados com as moléculas HLA-A*26:01 (FIVYIIFVY; posição 60-68), HLA-A*02:01 (LLIRPLLLSV; posição 27-36), que obtiveram o Percentile rank de 0.17. O mesmo método Consensus (ann/smm) adotado pelo software IEDB, permitiu elencar outros epítopos, tais como HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLAA*68:01, HLA-A*68:02, HLA-A*33:01, HLA-A*23:01. Em relação aos alelos HLA-B, o melhor Percentile rank foi de 0.41, mediante a análise do método Consensus (ann/smm), representado pelo alelo HLA-B*15:01 (ASAFRCFIVY; posição 54-63); no entanto, outros alelos também foram anotados, tais como o HLA-B*51:01 e o HLA-B*57:01. Não foi observado formação de epítopos imunogênicos com moléculas HLA-C. O escore de imunogenecidade obtido para a amostra de referência foi de 1.85434. Na análise dos epítopos mapeados com as moléculas pertencentes ao MHC-II (HLADR, -DP and -DQ), para a amostra de referência K02718, observamos que o método mais utilizado foi o Consensus (comb.lib./smm/nn). Os valores de referência do IEDB para a seleção dos epítopos foram percentile rank < 1 e IC50(nM). Sendo assim, observamos que os principais epítopos formados pela amostra de referência K02718 foram representados pelos alelos HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01 (FIVYIIFVYIPLFLI; posição 60-74), HLADPA1*03:01/DPB1*04:02 (STYTSLIILVLLLWI; posição 37-51), HLA-DRB1*07:01 (YIPLFLIHTHARFLI, posição 68-82), HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02 (TNLDTASTTLLACFL; posição 2-16), HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02 (MTNLDTASTTLLACF, posição 01-15), HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01 (RCFIVYIIFVYIPLF, posição 58-72), HLA-DRB1*11:01 (LIILVLLLWITAASA, posição 42-56), HLA-DRB5*01:01 (VYIIFVYIPLFLIHT, posição 62-76), HLA-DRB1*01:01 (ILVLLLWITAASAFR, posição 44-58) e HLA-DRB1*01:01 (IILVLLLWITAASAF, posição 43-57).

Na etapa de mapeamento dos epítopos imunogênicos foram observadas várias regiões da proteína que apresentam interações com as moléculas do MHC-I e MHC-II, o que pode simbolizar uma forma de atuação do sistema imunológico, afim de evitar uma evasão do vírus. A predição computacional de regiões de ligação com moléculas do MHC classe I vem sendo amplamente utilizada na identificação de epítopos imunogênicos e no desenvolvimento de estratégias vacinais. Para isso, várias

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

ferramentas e pesquisas em bioinformática tem permitido a predição de sítios de ligação de peptídeos às moléculas pertencentes à classe I e II do MHC, a exemplo do software on line IEDB.

A relevância destes achados, que envolve um estudo in silico da oncoproteína E5, está no aumento das informações acerca do comportamento do sistema imunológico dos seres humanos em relação à biologia da infecção viral, nos estágios iniciais ou mais avançados das lesões, que podem culminar com o desenvolvimento do câncer cervical, através da evasão viral do sistema imunológico.

As análises in silico foram fundamentais para a identificação de regiões relacionadas à formação de epítopos imunogênicos. As variações encontradas na sequência de aminoácidos da oncoproteína E5 dos HPVs 16 e 31, apresentaram regiões de epítopos com o MHC classe I e MHC classe II.

A oncoproteína E5, nas células infectadas, tem demonstrado o potencial de alterar a apresentação dos antígenos celulares, reduzindo a expressão de moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA), de Classe I, e também está relacionado em alterar a expressão de moléculas do MHC classe II na superfície celular (ASHRAFI *et al*., 2005; ZHANG *et al*., 2007).

As moléculas do complexo HLA-A estiveram mais relacionadas com a ação da oncorproteína 16E5 e 31E5. No entanto, outras moléculas não-clássicas também podem ser alvos moleculares de E5, comprometendo o sistema imunológico do paciente. Percebeu-se que as substituições de aminoácidos presentes na oncoproteína 16E5 conduziram para discretas modificações na estrutura secundária, que pode refletir numa interação celular diferenciada entre a oncoproteína E5 e os seus alvos (Tais modificações podem ser observadas nas figuras contidas no apêndice A).

A regulação do MHC classe I por E5, para impedir o reconhecimento das células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos, ajuda a diminuir a sua expressão na superfície celular, deixando as células suscetíveis ao reconhecimento e ataque pelas células Natural Killers (NK). Estas células possuem receptores que reconhecem moléculas clássicas (inclusive HLA-C) e não clássicas (HLA-E) de HLA classe I. Quando essas moléculas não estão presentes e não são reconhecidas ocorre a lise celular mediada por NK. Por este motivo, a oncoproteína E5 consegue inibir a expressão na superfície celular de HLA-A e HLA-B, mas não altera a expressão de HLA-C e HLA-E, evitando a morte celular tanto pela via de linfócitos T citotóxicos quanto pela via das células NK (CAMPO *et al*., 2010).

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

Nath *et al*. (2006) avaliaram o impacto das seguintes variantes de 16E5: Leu44Val65, Thr37Leu44Val65, Thr64 e Tyr8 Leu44Val65, cujos produtos de amplificação foram clonados em pcDNA3.1Myc-His e, posteriormente, avaliaram os resultados destas construções em células NIH-3T3 transfectadas. Os resultados observados foram um aumento nos níveis de expressão da construção Tyr8 Leu44Val65 em relação a Thr37Leu44Val65 e Leu44Val65, e baixos níveis de transcritos gerados pela variante Thr64.

A variante Leu44Val65 foi a responsável em provocar a maior redução na fase G0-G1 e, nas etapas subsequentes do ciclo celular, um aumento da fase G2-M, sugerindo que estas variantes estejam relacionadas ao crescimento celular (NATH *et al*., 2006).

I65V e I44L também foram relacionados à repressão de p21 (NATH *et al*., 2006). Apesar dos resultados apresentados, ainda não dispomos de relatos sobre o papel exercido pelos polimorfismos em 16E5 isoladamente, nem tampouco de construções gênicas contendo múltiplas substituições de nucleotídeos numa mesma variante.

Estruturalmente, 16E5 corresponde a uma proteína α-hélice transmembrana (BIBLE *et al*., 2000; NATH *et al*., 2006; SAAVEDRA *et al*., 2012). Plesa *et al*. (2014) realizaram uma análise dos polimorfismos circulantes na Romênia e as mutações mais prevalentes foram T3904A, T3910C, G3919C, T3928C, A3978C, T3988C, T3991G, T4033C, A4041G/C, onde os respectivos códons mutantes passaram a ser representados pelos seguintes resíduos de aminoácidos: F19I, V21A, C24S, L27P, I44L, L47S, L48A, V62A, I65V/L.

O sequenciamento do oncogene 16E5 e a análise da sua heterogeneidade também foi avaliado em amostras de pacientes com neoplasia intraepitelial grau III (CIN III) e carcinoma cervical na Suécia, onde um total de 09 variações foram identificadas, dentre as quais cinco delas não-sinônimas, e as mais comuns ocorreram na posição 3979 e 4042 (HU *et al*., 2001). Este resultado reflete a circulação das variantes nos resíduos 44 e 65 da oncoproteína E5 na Suécia; esta variação também esteve amplamente distribuída na população do Reino Unido. Todas estas variações intratípicas se tornaram objeto de estudo para a avaliação dos epítopos imunogênicos formados pelas variantes 16E5. Este fato se deve, principalmente, por saber que esta oncoproteína tem sido considerada um alvo de estudo para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas e para o desenvolvimento de vacinas (CORDEIRO *et al*., 2014). Sendo assim, uma análise in silico prévia contribui para o delineamento de novas estratégias imunoterapêuticas.

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

Kumar *et al*. (2015) idealizaram um estudo in silico objetivando a identificação de epítopos da oncoproteína E5 do HPV16, utilizando a sequência de referência K02718 do HPV16. Para o mapeamento dos epítopos, foi utilizado a plataforma IEDB, cujos os parâmetros para o MHC-I foram percentile value < 1.0 e, para o MHC-II, além do percentile value infecção para o estudo de novos métodos que possam estar relacionados com o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização dessa pesquisa permitiu as seguintes apreensões:

- A utilização do Software MEGA6 se mostrou como uma importante ferramenta de identificação de regiões polimórficas do oncogene e da oncoproteína E5 do HPV16.
- As mutações não-sinônimas promovem sensíveis mudanças no arcabouço da estrutura secundária da oncorproteína 16E5. No entanto, é necessário realizar estudos com cultura de células para se averiguar o impacto destas mutações sobre a persistência e progressão das lesões.
- Embora o exame do Papanicolau seja considerado o padrão-ouro e adotado pelo Ministério da Saúde, no Brasil, ficou evidenciado que a análise molecular traz resultados mais conclusivos sobre a presença de variantes com alto potencial oncogênico presentes em lesões de baixo grau.
- O estudo e o mapeamento de epítopos imunogênicos são extremamente úteis para a idealização de novas estratégias de identificação e combate à progressão das lesões de forma precoce.
- A biologia computacional traz uma nova vertente de estudo científico, onde os custos podem ser minimizados, utilizando-se pacotes de softwares, antes da idealização de experimentos e a replicação destes dados até a sua validação.
- O estudo dessas variantes implica na ampliação do conhecimento sobre o potencial de infecção das variantes dos HPVs 16 e 31, contribui para acrescentar o conhecimento sobre sua construção genética e seu potencial carcinogênico.
- As mutações identificadas precisam ser avaliadas com o auxílio de estudos funcionais que levem a uma melhor interpretação do impacto dessas mutações no curso do processo carcinogênico, uma vez que os testes in silico demonstraram alterações conformacionais na estrutura proteica das variantes estudadas, bem como a formação de

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

epítopos imunogênicos, que pode ser útil para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas.

REFERÊNCIAS

ASHRAFI, G. Hossein *et al*. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. International Journal Of Cancer, [s.l.], v. 113, n. 2, p.276-283, jan. 2004.

BERNARD, Hans-ulrich *et al*. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology, [s.l.], v. 401, n. 1, p.70-79, maio 2010.

BIBLE, Jon M. *et al*. Cervical lesions are associated with human papillomavirus type 16 intratypic variants that have high transcriptional activity and increased usage of common mammalian codons. Journal Of General Virology, [s.l.], v. 81, n. 6, p.1517-1527, jun. 2000.

BURK, Robert D.; HARARI, Ariana; CHEN, Zigui. Human papillomavirus genome variants. Virology, [s.l.], v. 445, n. 1-2, p.232-243, out. 2013.

CAMPO, M. S. *et al*. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. Virology. v. 407, n.1, p. 137-142, nov. 2010.

CECCARELLI, Manuela *et al*. Head and neck squamous cell carcinoma and its correlation with human papillomavirus in people living with HIV: a systematic review. Oncotarget, [s.l.], v. 9, n. 24, p.17171-17180, mar. 2018.

CHAGAS, Bárbara S. *et al*. New variants of E6 and E7 oncogenes of human papilomavírus type 31 identified in Northeastern Brazil. Gynecologic Oncology, [s.l.], v. 123, n. 2, p.284- 288, nov. 2011.

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

CHAGAS, Bárbara Simas *et al*. Novel E6 and E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazilian women with abnormal cervical cytology. Infection, Genetics And Evolution, [s.l.], v. 16, p.13-18, jun. 2013.

CORDEIRO, Marcelo Nazário *et al*. Anti-tumor effects of genetic vaccines against HPV major oncogenes. Human Vaccines & Immunotherapeutics, [s.l.], v. 11, n. 1, p.45-52, nov. 2014.

DIMAIO, Daniel; PETTI, Lisa M. The E5 proteins. **Virology**, [s.l.], v. 445, n. 1-2, p. 99-114, out. 2013.

DOORBAR, John. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. Virology, [s.l.], v. 445, n. 1-2, p.80-98, out. 2013.

FREITAS, Antonio Carlos de *et al*. HrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies. Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research, [s.l.], v. 36, n. 1, p.1-15, 25 maio 2017.

FREITAS, Antonio Carlos de *et al*. Susceptibility to cervical cancer: Na overview. Gynecologic Oncology, [s.l.], v. 126, n. 2, p.304-311, ago. 2012.

GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz *et al*. Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. Biomed Research International, [s.l.], v. 2015, p.1 12, 2015.

HU, Xinrong *et al*. Oncogene lineages of human papillomavirus type 16 E6, E7 and E5 in preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinoma. The Journal Of Pathology, [s.l.], v. 195, n. 3, p.307-311, ago. 2001.

KRÖGER, P. Molecular Biology Data: Database Overview, Modelling Issues, and Perspectives. Zorneding, 2001.

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

KUMAR, Anoop *et al*. Identification of immunotherapeutic epitope of E5 protein of human papillomavirus-16: An in silico approach. Biologicals, [s.l.], v. 43, n. 5, p.344-348, set. 2015.

LEE, S. I.; CATALANO, O. A.; DEHDASHTI, F. Evaluation of Gynecologic Cancer with MR Imaging,18F-FDG PET/CT, and PET/MR Imaging. The journal of nuclear medicine, v. 56, n. 3, March 2015.

LI, Ni *et al*. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. International Journal Of Cancer, [s.l.], v. 128, n. 4, p.927-935, 19 abr. 2010.

LI, N. *et al*. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among Daqing City women in China with normal cytology: a pilot prospective study. Oncotarget, v. 8, n. 46, p. 81455-81461, Agosto 2017.

MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinformatics, [s.l.], v. 16, n. 4, p.404-405, abr. 2000.

MONFRÉ, Elaine Rodrigues Mello. Avaliação dos níveis de citocinas e HLA-G solúvel em linhagens celulares tumorais de colo uterino tratadas com alcalóides de Pterogyne nitens. 2011. xi, 176 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2011.

NATH, Rahul *et al*. Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. Cancer Cell International, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-9, ago. 2006.

PLESA, Adriana *et al*. Molecular variants of human papilloma virus 16 E2, E4, E5, E6 and E7 genes associated with cervical neoplasia in Romanian patients. Archives Of Virology, [s.l.], v. 159, n. 12, p.3305-3320, ago. 2014.

POTTER, C. D. *et al*. The European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology Guidelines for

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

the Management of Patients With Cervical Cancer. International Journal Of Gynecologic Cancer, [s.l.], v. 28, n. 4, p.641-655, maio 2018.

SAAVEDRA-PEDRAZA, A. *et al*. Molecular Bases of Human Papillomavirus Pathogenesis in the Development of Cervical Cancer. In: BROEK, D. V. (Ed.). Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - Research aspects. [s.l], 2012. ISBN: 978- 953-307-855-7.

SCHIFFMAN, M. *et al*. A Study of the Impact of Adding HPV Types to Cervical Cancer Screening and Triage Tests. Jnci Journal Of The National Cancer Institute, [s.l.], v. 97, n. 2, p.147-150, jan. 2005.

SCHIFFMAN, M.; Wentzensen, N. From human papillomavirus to cervical cancer. Obstetrics & Gynecology, v. 116, n. 1, p. 177-185, 2010.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human Papillomavirus Infection and the Multistage Carcinogenesis of Cervical Cancer. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, [s.l.], v. 22, n. 4, p.553-560, abr. 2013.

SMITH, Benjamin *et al*. Sequence Imputation of HPV16 Genomes for Genetic Association Studies. Plos One, [s.l.], v. 6, n. 6, p. e21375, jun. 2011.

STEENBERGEN, Renske D.m. *et al*. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. Journal Of Clinical Virology, [s.l.], v. 32, supl. 1, p.25-33, mar. 2005.

SUN, Zhengrong *et al*. Genetic variations of E6 and long control region of human papillomavirus type 16 from patients with cervical lesion in Liaoning, China. Bmc Cancer, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-8, out. 2013.

TAMURA, K. *et al*. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using MaximumLikelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology And Evolution, [s.l.], v. 28, n. 10, p.2731-2739, maio 2011.

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

TAMURA, K. *et al*. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology And Evolution, [s.l.], v. 28, n. 10, p.2731-2739, maio 2011.

VENUTI, Aldo et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.140-158, nov. 2011.

ZHANG, Lei *et al*. Human papillomavirus infections among women with cervical lesions and cervical cancer in Eastern China: genotype-specific prevalence and attribution. Bmc Infectious Diseases, [s.l.], v. 17, n. 1, p.107-115, 31 jan. 2017.

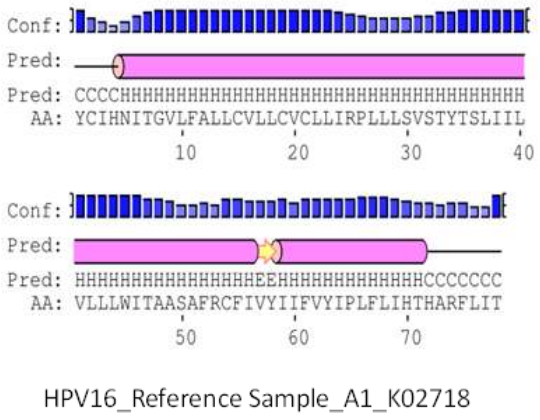
ZHANG, Shen-ying *et al*. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. Immunological Reviews, [s.l.], v. 220, n. 1, p.225-236, dez. 2007.

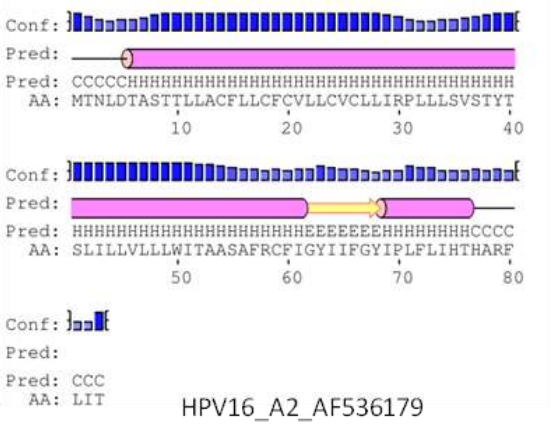
DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

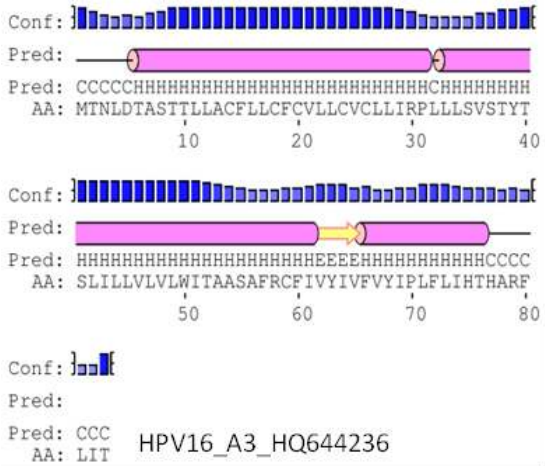
Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

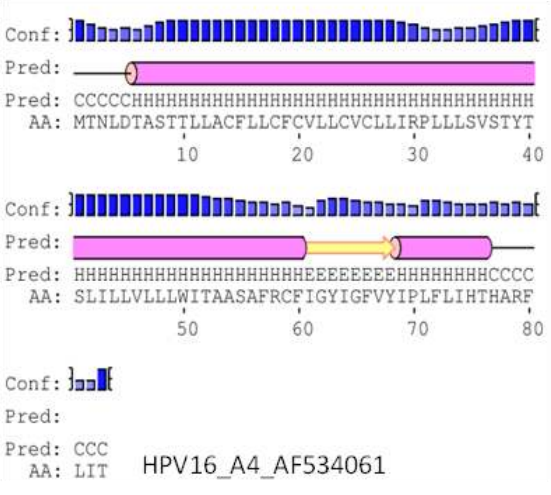
Artigo

APÊNDICE A – Predição da estrutura secundária da oncoproteína 16E5 geradas por meio do software PSIPRED





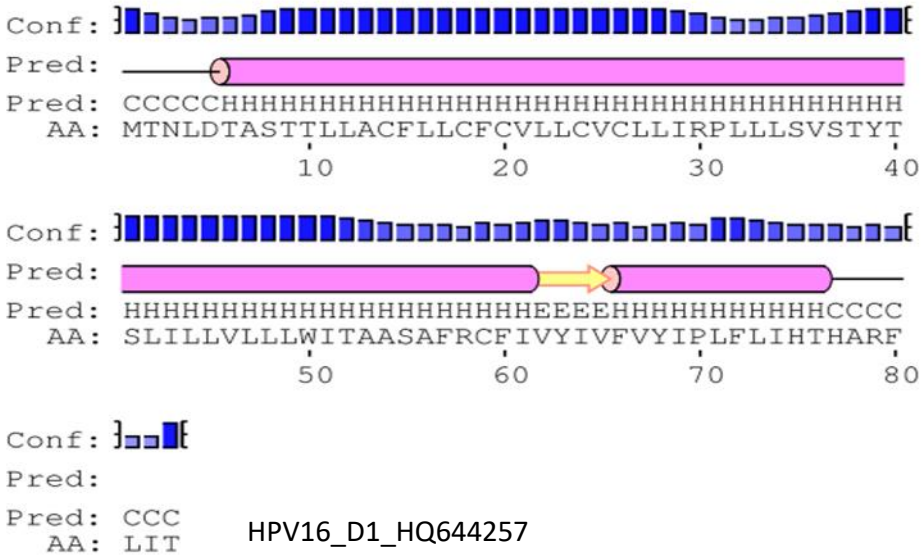




DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo

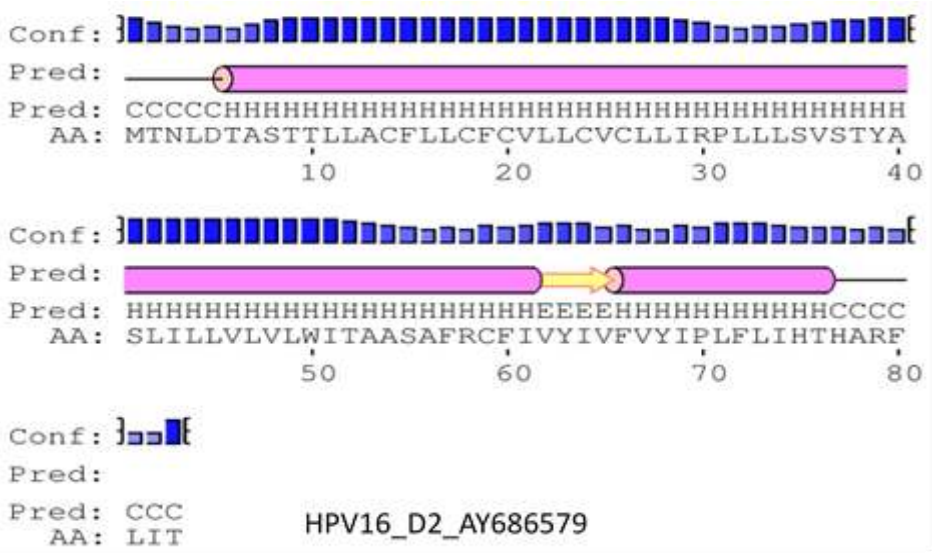


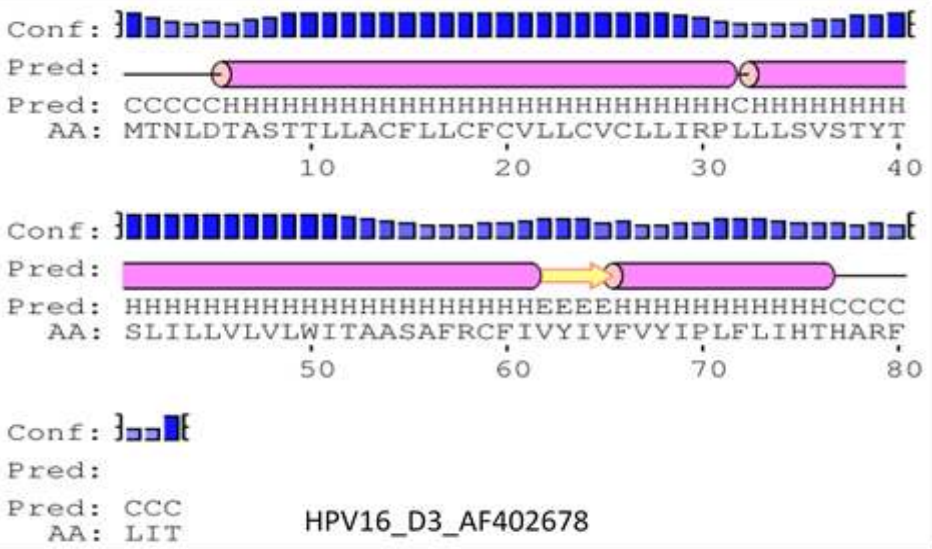
HPV16_D1_HQ644257

DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42

Temas em Saúde
Volume 23, Número 1
ISSN 2447-2131
João Pessoa, 2023

Artigo





DOI: 10.29327/213319.23.1-2
Páginas 24 a 42