

**Identificação de epítomos de Papilomavirus Humano 16 e 18  
ativadores de células T CD4+ e T CD8+ candidatos ao  
desenvolvimento de vacina terapêutica, uma abordagem *in silico***

**Rayane Valezi Gonçalves**

**Ribeirão Preto  
2022**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Identificação de epítomos de Papilomavirus Humano 16 e 18  
ativadores de células T CD4+ e T CD8+ candidatos ao  
desenvolvimento de vacina terapêutica, uma abordagem *in silico*.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

**Orientada:** Rayane Valezi Gonçalves

**Orientadora:** Profa. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo

**Versão corrigida da Dissertação Simplificada de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 27/06/2022.  
A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

Ribeirão Preto  
2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Gonçalves, Rayane Valezi

Identificação de epítomos de Papilomavirus Humano 16 e 18 ativadores de células T CD4+ e T CD8+ candidatos ao desenvolvimento de vacina terapêutica, uma abordagem *in silico*.  
Ribeirão Preto, 2022.

61p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: Russo, Elisa Maria de Sousa.

1. Proteínas. 2. Imunoinformática. 3. HPV. 4. Vacina.

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a todos os cientistas  
e profissionais da saúde que têm mantido a chama da  
ciência acesa iluminando estes tempos de escuridão.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais Raimundo e Solimar e à minha irmã Maria Cecília, meus maiores amores de todo o universo e a razão por eu ainda seguir em frente.

Agradeço ao meu companheiro e luz dos meus dias Gabriel, por sempre estar ao meu lado mesmo nos dias mais cinzas onde nem eu mesma me reconheço. É uma honra dividir esse período do espaço-tempo com você.

Gratidão a todos os meus amigos que mesmo distantes seguem sendo um ponto de segurança, Fernando, Marina, Letícia, Pietra e Larissa, vocês são o meu Norte nessa vida.

Agradeço também às mulheres mais agressivas que eu tive o prazer de conhecer. Nicole e Allana, com vocês pude sentir a amizade apaziguar a saudade de casa com carinho e doçura. Agradeço também aos meus colegas de trabalho e laboratório que mesmo em meio ao isolamento, sempre se fizeram presentes nas chamadas por vídeo.

À minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Elisa Maria de Sousa Russo, minha eterna gratidão por sua paciência e seu direcionamento. Obrigada por ter aceitado o desafio deste trabalho e por me socorrer em cada dúvida.

À Professora Dr<sup>a</sup> Silvana Giuliatti meus agradecimentos pela sua sabedoria e as lições que me ensinou, renovando meu interesse por essa área de estudo.

Ao Dr. Carlos Alessandro Fuzo, não tenho palavras para expressar como sua ajuda e seu conhecimento foram fundamentais. Muito obrigada por cada reunião.

Ao Dr. Lucas Messas e a Dr<sup>a</sup> Nyanne Bosaipo eu agradeço pela minha vida. Algumas caixas são difíceis demais de organizar sozinha, mas vocês têm me guiado brilhantemente por dentro da minha própria bagunça.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

GONÇALVES, R. V.; **Identificação de epítomos de Papilomavirus Humano 16 e 18 ativadores de células T CD4+ e T CD8+ candidatos ao desenvolvimento de vacina terapêutica, uma abordagem in silico**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O Papilomavírus Humano provoca lesões pré-cancerosas no epitélio cervical, podendo evoluir para um câncer cervical, considerado o quarto tipo de câncer mais comum entre mulheres mundialmente. Embora existam vacinas profiláticas disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS), a eficácia foi comprovada apenas em quem ainda não havia sido exposto ao vírus. O uso de vacinas com as oncoproteínas E6 e E7 já se mostrou promissor na redução das lesões causadas por HPV. Baseado em vacinologia reversa, identificou e selecionou epítomos das proteínas E6 e E7 de HPV16 e HPV18, capazes de ativar as células CD4 e CD8. Usando a abordagem imunoinformática, as sequências de aminoácidos foram selecionadas de um banco de dados, e a identificação de epítomos foi realizada com base na afinidade de ligação ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) II e MHC I. Esses epítomos foram filtrados por ferramentas que avaliam antigenicidade, alergenicidade, toxicidade e afinidade entre complexo e receptor da célula T. *Linkers* foram anexados a cada peptídeo para clivagem e cada um foi analisado usando *docking* computacional (CD) para avaliar a energia de ligação. Os que se enquadraram nos parâmetros favoráveis foram avaliados em conservação e cobertura populacional. Utilizando as ferramentas imunoinformáticas, selecionamos seis epítomos de E6 e quatro epítomos E7 do HPV16, quatro epítomos E6 e sete epítomos E7 do HPV18, ambos com afinidade MHC II. Para o MHC I, foram selecionados quatro epítomos E6 e dois epítomos E7 do HPV16, bem como três epítomos E6 e dois epítomos E7 do HPV18. O *docking* computacional encontrou as melhores energias de ligação entre o Antígeno Leucocitário Humano (HLA) e os epítomos, ajudando no refinamento da seleção. Conservação e cobertura populacional confirmaram o melhor conjunto de epítomos. Ainda que as metodologias *in silico* possam prever as respostas citotóxicas e das células T auxiliares, numerosos processos complexos estão envolvidos na resposta imunológica humana e, por isso, são necessários mais testes para confirmar essas previsões. Essa coleção de epítomos selecionada pode resultar numa vacina terapêutica de multiepítomos capaz de reduzir as lesões pré-cancerosas e ajudar a eliminação da infecção por HPV.

**Palavras-chave:** imunoinformática, HPV, epítomos, vacina.

## ABSTRACT

GONÇALVES, R. V.; **Identification of Human Papillomavirus 16 and 18 epitopes activating CD4+ and CD8+ T cells candidates for therapeutic vaccine development, an *in silico* approach.** Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The Human Papillomavirus can induce precancerous lesions in the cervical epithelium, which can evolve into cervical cancer, considered the world's fourth most common cancer among women. Although there are prophylactic vaccines available on Sistema Único de Saúde (SUS), Brazil's public health-care system, the effectiveness has been proven only in those not previously exposed to the virus. The use of vaccines with the oncoproteins E6 and E7 has already been demonstrated. Based on reverse vaccinology, this project intended to identify and select epitopes of E6 and E7 HPV16 and HPV18 proteins capable of CD4 and CD8 cells activation. Using the immunoinformatic approach, the amino acids sequences were selected from a data bank, and the epitopes identification, based on bind-affinity for the Major Histocompatibility Complex (MHC) II and MHC I, was realized. These epitopes were filtered with immunoinformatic tools that measure antigenicity, allergenicity, toxicity, and complex affinity to T cell receptors. A sequence of amino acid *linkers* was attached to each peptide on the *linkers'* cleavage point, and each peptide was then analyzed by computational *docking* (CD) for ligand energy evaluation. Those suited to the CD expected parameters were measured for conservancy and population coverage. Using the immunoinformatic tools, we selected 6 E6 epitopes and 4 E7 epitopes from HPV16 with MHCII affinity, 4 E6 epitopes, and 7 E7 epitopes from HPV18. For MHCI, 4 E6 epitopes, and 2 E7 epitopes from HPV16, 3 E6 epitopes and, 2 E7 epitopes from HPV18 were selected. The computational *docking* shows the best energy ligation between HLA and the epitopes, helping in the selection refinement. Conservancy and populational coverage confirmed the best set of epitopes. Although *in silico* methodologies can make predictions of cytotoxic and helper T cell response, a lot of complex processes are involved in human immunologic response, and more tests are needed to confirm predictions. We expect to test the epitopes selected to be used, in the future, in a therapeutic multi-epitopes vaccine capable of reducing the precancerous lesions and help the elimination of HPV infection.

**Keywords:** immunoinformatic, HPV, epitopes, vaccine



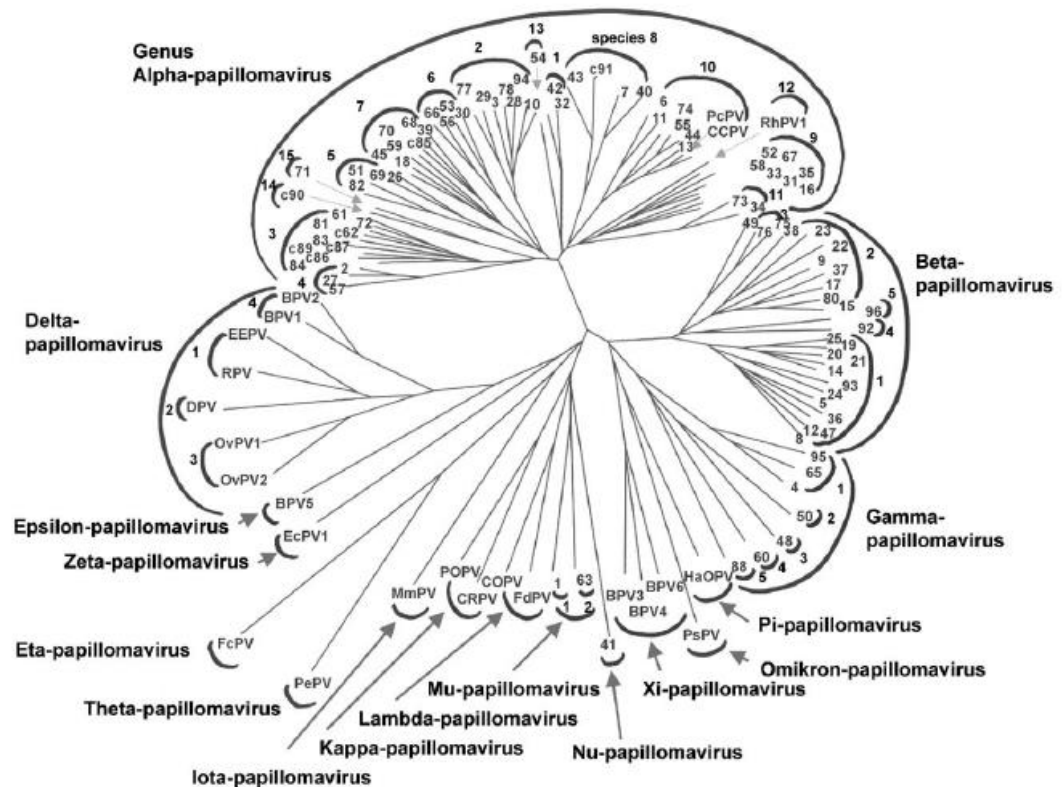


# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PAPILOMAVIRUS HUMANO E PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO

O Papilomavirus Humano (HPV) é um vírus icosaédrico e não envelopado da família Papillomaviridae. Seu material genético é composto por dupla fita circular de DNA, com 8 mil pares de bases e 60 nm de diâmetro (HARDEN; MUNGER, 2017). A identificação dos tipos virais que compõem a família dos Papilomavirus (PVs) é feita a partir da homologia entre a ORF (Open Reading Frame) da proteína L1. Quando identificada uma diferença igual ou maior a 10% nesse gene o HPV é considerado de um novo tipo. Uma diferença entre 2% e 10% configura um novo subtipo. Uma variante se apresenta quando a diferença na homologia é de menos de 2% (DE VILLIERS et al., 2004).

**Figura 1. Árvore filogenética contendo 118 tipos de papilomavírus com base no gene da região L1. O semicírculo externo representa o gênero e o semicírculo interno refere-se à espécie do papilomavírus.**



Fonte: adaptado de Villiers et al., 2004.

Dentro da família dos PVs, recebem destaque pela sua importância médica e capacidade de infecção em tecidos mucocutâneos humanos os vírus do gênero Alphapapillomaviruses (DOORBAR et al., 2012). Este gênero foi subdividido em grupos com base na estimativa de risco e potencial oncogênico viral, sendo: 12 tipos (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, e CP6108) não-oncogênicos classificados como baixo risco (BR) e que comumente causam displasia de baixo grau, verrugas genitais e papilomatose respiratória; 15 tipos (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, e 82) de alto risco (AR) com potencial oncogênico associado à lesões de alto grau e câncer; 3 tipos de provável alto risco (26, 53 e 66) e 3 tipos de risco indeterminado (34, 57 e 83) (MUÑOZ et al., 2003).

Embora diferentes tipos de HPVs causem diferentes tipos de lesão nos tecidos epiteliais, estima-se que os HPVs de AR são os responsáveis por 35% dos cânceres penianos, 50% dos cânceres vulvares, 60% dos cânceres vaginais, 70% dos cânceres de orofaringe, 95% dos cânceres anais e mais de 99% dos cânceres cervicais (CC) (GRAHAM, 2017; HARDEN; MUNGER, 2017). Os tipos 16 e 18 são encontrados em maior prevalência, representando, juntos, 50% das lesões de alto grau, 70% dos CC invasivos e 81,5% dos adenocarcinomas (SANJOSÉ et al., 2007).

A infecção por HPV é altamente prevalente na população sexualmente ativa, sendo considerada pelo CDC (Center for Disease Control and Prevention) como a infecção sexualmente transmissível mais comum (ZUR HAUSEN, 2002; CDC, 2015). É estimado que 80% das mulheres terão contato com o vírus pelo menos uma vez na vida (DOORBAR et al., 2012). No Brasil, a prevalência de jovens entre 16 e 25 anos infectados por HPV se mostrou maior que 50%, enquanto em toda população com citologia normal a infecção é encontrada em mais de 25% (COLPANI et al., 2020; WENDLAND et al., 2020). Embora grande parte das infecções virais e, até mesmo, das lesões pré-cancerosas possam regredir espontaneamente (80-90% e 60%, respectivamente), 4-10% dos casos poderão se tornar persistentes e, se não detectados, possivelmente evoluir para CC (ZUR HAUSEN, 2002; GRAHAM, 2017; BOSCH et al., 2013).

O câncer cervical é o quarto câncer mais comumente diagnosticado no mundo e a quarta maior causa de mortes por câncer em mulheres. No ano de 2020, são estimados 604,000 novos casos na população mundial e 342,000 mortes (SUNG et al., 2021). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) estima que na ausência de intervenções de saúde, 44.4 milhões de casos de câncer cervical serão

diagnosticados até 2069, sendo que dois terços se darão em países com baixo ou médio IDH. A previsão é de que o CC cresça aproximadamente 460.000 mortes por ano (BRISSEON et al. 2020).

## 1.2 MECANISMO DE INFECÇÃO E FUNÇÕES PROTEICAS

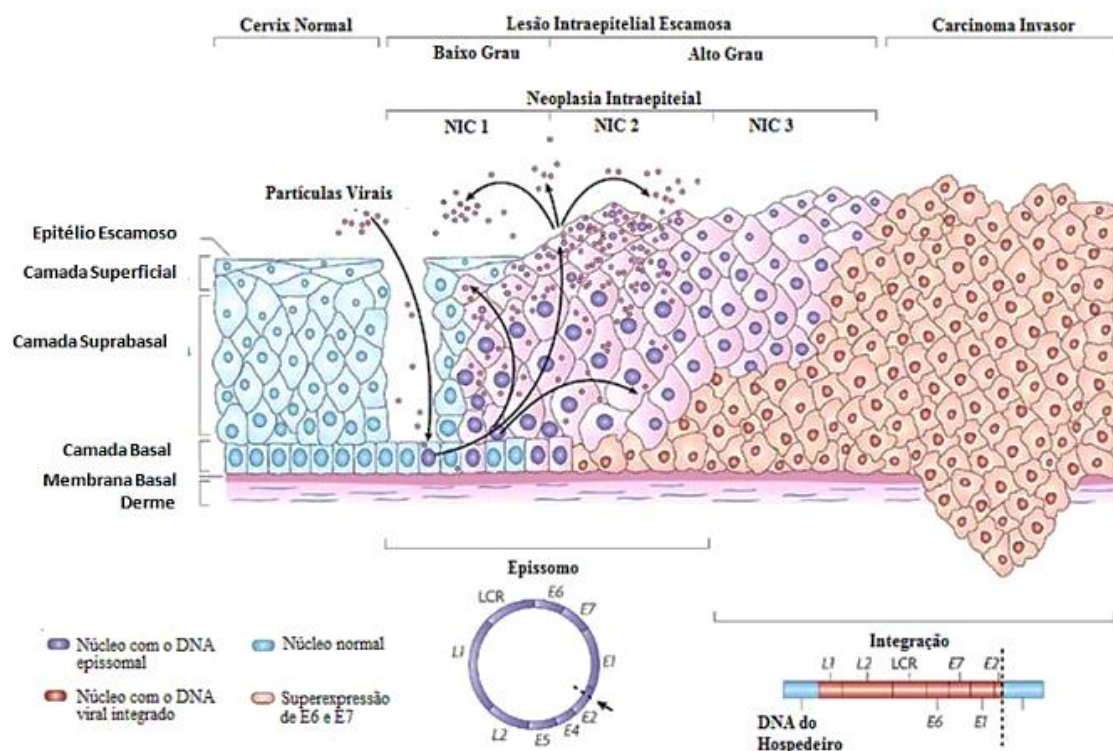
O mecanismo de infecção do HPV está diretamente ligado ao ciclo celular visto que suas células-alvo são as células-tronco intraepitelial, responsáveis pela manutenção do tecido. Os vírus infectam as células basais indiferenciadas entrando em razão das micro lesões existentes causadas por diversos fatores como relações sexuais, alteração do pH vaginal, dentre outros, e se replicam a partir da diferenciação em células filhas (HONG; LAIMINS, 2013). A área da junção escamo-colunar (JEC) é particularmente suscetível à infecção viral devido a sua camada única de células cuboidais (HERFS et al., 2012).

O tempo para internalização viral é estimado em 2-4h, sendo a principal proteína do capsídeo (do inglês *late*) L1 determinante para ligação inicial. Nas células queratinosas, a via das proteoglicanas de heparan-sulfato (HSPG) é a mais conhecida e estudada via primária de ligação. Essa glicosaminoglicana encontra-se expressa na superfície das células e está presente na matriz extracelular (SCHILLER; DAY; KINES, 2010). O HPV inicia sua infecção à célula hospedeira se ligando fortemente a HSPG na membrana celular e com a HSPG presente na matriz celular, além de interagir com receptores cognatos diversos, como os receptores de fatores de crescimento,  $\alpha 6\beta 4$  integrina, entre outros, essenciais para o sucesso da infecção. A ligação promove uma alteração na conformação do capsídeo viral, que segundo estudos de Bienkowska-Haba et al. (2009) é mediada por cliclofilina B e expõe proteína L2, permitindo sua clivagem na porção N-terminal (aa 17–36) por furinas (OZBUN, 2019; GRAHAM, 2017).

O HPV é então internalizado assincronicamente por mecanismo de endocitose similar a macropinocitose, sendo depositado em organelas ácidas semelhantes a endossomos clássicos e posteriormente fundidas com endossomos iniciais (SCHELHAAS et al., 2012; LIPOVSKY et al., 2017; SPODEN et al., 2013). A maturação para endossomo tardio ocorre e o baixo pH resultante acarreta um processo de desnudamento de pelo menos parte da proteína de capsídeo L1, sua

dissociação bem como exposição da proteína L2 e do genoma viral (SCHELHAAS et al., 2012). A proteína menor do capsídeo se associa à anexina 17 e forma um complexo com o genoma viral que se torna capaz de escapar do endossomo celular e seguir pela rede trans-Golgi. Esse mecanismo encontra-se preservado entre diferentes tipos de HPV, indicando ser um recurso essencial para a virulência. (DAY et al., 2013; BERGANT; BANKS, 2013; BERGANT MARUŠIČ et al., 2012). A fragmentação da membrana nuclear ocorrida durante a mitose celular permite a entrada e inserção desse complexo L2/DNA no núcleo celular (CALTON et al., 2017; YEON et al., 2009).

**Figura 2. Infecção intraepitelial por HPV.** Após a infecção, inicia-se a expressão das proteínas da região “E” e a replicação do DNA episossomal (núcleo roxo) do vírus na camada supra basal. Na camada superficial, o genoma viral, ainda na forma episossomal, é altamente replicado e há a expressão da proteína E4 e das proteínas L1 e L2, responsáveis pela montagem e liberação da partícula viral, que inicia uma nova infecção. Durante a infecção persistente com HPV de alto risco pode ocorrer a integração do genoma viral no DNA do hospedeiro (núcleo em vermelho), que culmina na ruptura do gene E2 e subsequente superexpressão das oncoproteínas E6 e E7, promovendo a transformação da célula hospedeira e o desenvolvimento do câncer cervical.



Fonte: Adaptado de Woodman et al. (2007)

É a partir da entrada no núcleo celular que o HPV se torna capaz de iniciar sua amplificação genômica, utilizando os recursos celulares para se replicar juntamente com a célula basal infectada durante a fase S e mantendo até 200 cópias episossomais

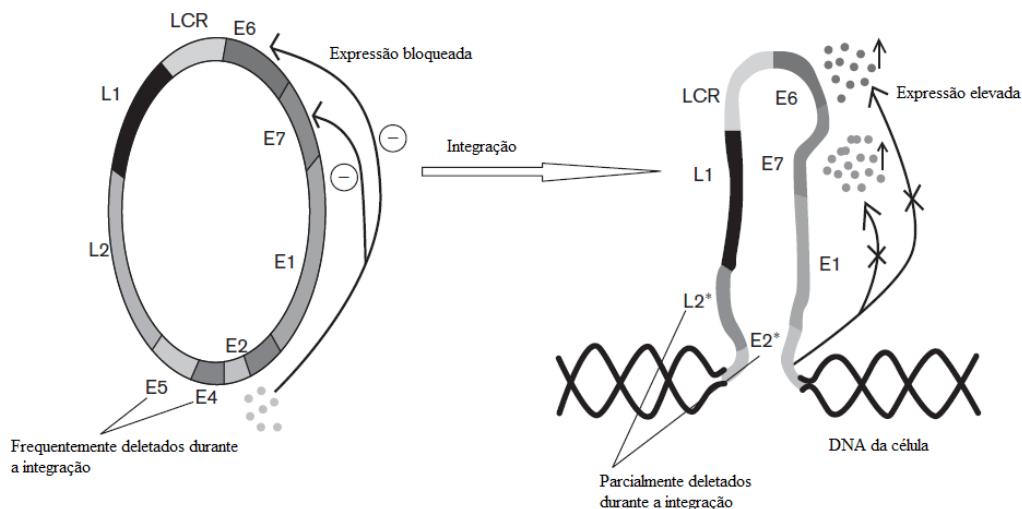
de alta estabilidade (DOORBAR et al., 2015). Os genes são então nomeados de acordo com a fase na qual eles se encontram mais abundantemente expressos. Durante a fase inicial da infecção, o DNA viral se encontra na forma episossomal e os genes da região “E” (*early*) possuem sua expressão aumentada, devido sua importância na ativação da amplificação do genoma viral (HEBNER; LAIMINS, 2006). A proteína E1 é ligante de DNA sítio-específica e possui atividade helicase dependente de ATP, ela catalisa o desenovelamento do DNA viral e se liga a subunidades de DNA-polimerase alfa, recrutando a maquinaria celular para o sítio de origem de replicação, tornando-a essencial para o início da síntese viral durante a fase de latência, quando o promotor tardio ainda está ativo (BERGVALL; MELENDY; ARCHAMBAULT, 2013; HEBNER; LAIMINS, 2006). A proteína E2 é a principal reguladora da transcrição gênica do HPV, ela recruta fatores celulares que podem ativar ou reprimir a transcrição viral, dependendo dos sítios de ligação e da função de cada fator celular associado. Ocasionalmente, com a integração do DNA viral ao genoma celular o gene de E2 é rompido e a repressão da síntese de proteínas oncogênicas cessa, contribuindo no processo de malignização celular (MCBRIDE, 2013). A proteína E4 se liga aos filamentos de citoqueratina rompendo sua estrutura e, acredita-se, propiciando o escape dos vírions produzidos. Além disso, juntamente com outras proteínas ela é responsável pela manutenção do estágio G2 do ciclo celular, dando ao vírus a chance de se multiplicar mais facilmente (HARDEN; MUNGER, 2017; NGUYEN; RAMÍREZ-FORT; RADY, 2014). A E5 é uma pequena proteína oncogênica, hidrofóbica, transmembrana de passagem única, que pode ser encontrada no retículo endoplasmático da célula infectada formando dímeros que regulam positivamente receptores de crescimento celulares e alteram o ciclo de mitose para favorecer a replicação celular. Ela também é capaz de reduzir o transporte do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I para a superfície da célula e reter o complexo dentro do complexo de Golgi por acidificação e interação com as cadeias pesadas dos antígenos leucocitários humanos (HLA) (DIMAIO; PETTI, 2013; LAZARCZYK et al., 2008; ASHRAFI et al., 2006). As proteínas E6 e E7 são as principais envolvidas no processo de malignização celular e são as proteínas alvo deste trabalho.

Conforme as células filhas se dividem e sofrem a diferenciação resultante da ação das proteínas virais, a expressão de genes da região “L” (*late*) é ativada completando a montagem do vírion e sua liberação pela superfície epitelial. As proteínas L1 e L2 são

responsáveis por estruturar o capsídeo viral, formado por 360 cópias da proteína L1 organizadas em 72 capsômeros pentaméricos ao redor de uma proteína L2 (HARDEN; MUNGER, 2017; TYRING, 2000; MIDDLETON et al., 2003). Essa é a fase não-produtiva, ou fase de latência, onde o genoma viral se mantém de forma episossomal e a infecção pode se manter por décadas.

Na grande maioria das lesões cervicais e tumores por HPV de alto risco ocorre a fragmentação do DNA viral episossomal, rompendo ou deletando a região da ORF de E2, e permitindo a sua integração ao DNA celular. Qualquer parte do genoma pode ser alvo dessa inserção viral, mas o DNA dos HPVs tem sido encontrado com maior frequência próximo às regiões frágeis de alta instabilidade [IMAGEM DO WOODMAN] (LONGWORTH; LAIMINS, 2004; THORLAND et al., 2003). O rompimento do gene de E2, que codifica a proteína responsável pela *downregulation* da expressão de proteínas oncogênicas, leva a superexpressão das proteínas E6 e E7 e por consequência à tumorigênese (NGUYEN; RAMÍREZ-FORT; RADY, 2014).

Figura 3. Representação do rompimento do episossomo e integração do genoma do HPV na célula humana hospedeira.



Fonte: Adaptado de Asiaf et al. (2014)

## 1.3 PROTEÍNAS ALVO

### 1.3.1 Proteína E6

A proteína E6 possui uma massa molecular de 16,5 kDa, que consiste em 151 aminoácidos com dois domínios de ligação ao zinco, chamados “zinc fingers” (CXXC), responsáveis por ativar o processo transcricional do HPV. Devido a sua estrutura

complexa, repleta de  $\alpha$ -hélices e  $\beta$ -folhas, a purificação e solubilidade da proteína na forma nativa e estável tem sido prejudicada, dificultando maiores estudos da proteína (NOMINÉ et al., 2001).

Caracterizada como uma oncoproteína, sua expressão acarreta hiperproliferação, perda de diferenciação celular e formação de tumores. A interação com diversas proteínas da célula epitelial a torna uma proteína multifuncional, capaz de inibir sinalizações celulares, induzir anormalidades cromossômicas e degradar outras proteínas. Sua função mais estudada é a degradação da proteína p53 (MOODY; LAIMINS, 2010; NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007).

Conhecido como um gene supressor de tumor, o p53 regula o crescimento celular e a apoptose, induzindo o reparo do DNA quando há pequenos danos ou levando à morte da célula quando os danos são graves (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007). Em infecções por HPV AR, a proteína E6 leva à proteólise do p53 de modo dependente de ubiquitina. A degradação de p53 mediada por E6 requer a proteína celular associada a E6 de 100 kDa (E6AP). E6AP e E6 juntas proporcionam atividade de proteína E3-ubiquitina ligase na transferência de ubiquitina para p53. A formação desse complexo resulta na ubiquitinação da p53 e conseqüentemente sua degradação pela via proteossomal. Desse modo, a replicação viral é favorecida e, por conseqüência, o acúmulo de alterações cromossômicas contribuem para a malignização da célula (SCHEFFNER et al., 1993).

Outras interações da proteína E6 também têm se destacado como importantes fatores na transformação celular. Dois exemplos disso são as interações com o gene da telomerase e com as proteínas do domínio PDZ (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007). A hTERT é uma enzima catalítica de transcriptase reversa que faz parte do complexo enzimático da telomerase. Normalmente, ela é expressa em células germinativas específicas ou células-tronco em proliferação, devido a sua capacidade de reconstituir a atividade desse complexo e suprimir a senescência celular. Porém, sua expressão também acontece em células cancerosas. Nos casos de infecção por HPV, a proteína E6 induz a transcrição da hTERT e, conseqüentemente, a atividade da telomerase. Há então a perpetuação do tamanho dos telômeros e a imortalização celular (LIU et al., 2009; NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007). Em contrapartida, a interação de E6 com as proteínas com domínio PTZ promove a degradação proteossomal das mesmas, causando a perda do contato célula-célula mediado pelas

junções comunicantes, alterando a polaridade celular, inibindo a sinalização e supressão tumoral (SPANOS et al., 2008).

### 1.3.2 Proteína E7

A proteína E7 possui 98 aminoácidos e três regiões conservadas localizadas na porção N-terminal, CR1, CR2 e CR3. A região CR3 possui domínio similar ao “zinc finger” da proteína E6. A região CR2 contém um domínio LXCXE, também chamado de “domínio de ligação da pRb” e uma região primária de fosforilação. Apesar da região LXCXE ser importante na ligação com a pRb (proteína do retinoblastoma), são as sequências da região CR1 que desempenham papel fundamental para a degradação da proteína (SONGOCK; KIM & BODILY, 2017).

As proteínas E7 de HPVs de AR e BR parecem possuir diferenças funcionais importantes, sendo as proteínas produzidas por HPVs AR capazes de induzir a instabilidade genômica da célula hospedeira, pela desregulação da organização dos centrossomos durante a divisão celular, e de se ligar com maior afinidade às pRb, levando a sua degradação (DOORBAR et al., 2012). A proteína pRb, quando hipofosforilada, regula negativamente o ciclo celular ao associar-se com o fator de transcrição E2F e inibe a progressão da fase G1 para a fase S. Ao ligar-se à pRb, a proteína E7 permite que o fator E2F fique livre, levando a transcrição de genes associados à replicação do DNA. Assim, a expressão da proteína E7 acarreta a proliferação desordenada da célula (MITTAL; BANKS; 2017; HOPPE-SEYLER et al., 2017).

Estudos demonstram que o bloqueio da expressão de E6 e/ou E7 contribui para a parada do crescimento tumoral, levando à senescência ou a apoptose das células tumorais (MITTAL; BANKS; 2017).

## 1.4 RESPOSTA IMUNE E EVASÃO VIRAL

O desenvolvimento tumoral é um mecanismo complexo que não depende apenas do acúmulo de danos e da regulação do ciclo celular. Na maioria dos casos a resposta imune humoral e celular do hospedeiro é capaz de eliminar o vírus e/ou



reparar as lesões causadas, inclusive em casos de infecções persistentes. Entretanto, 10% das pessoas infectadas ainda desenvolvem uma infecção persistente e aproximadamente 1% dessas desenvolvem CC (CROSBIE et al., 2013; SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012).

As duas oncoproteínas E6 e e7 também demonstraram ser capazes de suprimir a transcrição de IFNs nas células hospedeiras, impedindo sua função antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora (KOROMILAS; LI & MATLASHEWSKI, 2001). As células NK são reguladas pelos IFNs e possuem um importante papel na resposta inata à infecção viral devido a sua capacidade de matar células que apresentem sinais de infecção. Entretanto, foi observada uma baixa concentração dessas células em infecções causadas por HPVs. Essa diminuição está relacionada com a baixa expressão de IFN associado à capacidade da proteína E5 do HPV em suprimir uma glicoproteína MHC-I like, responsável por apresentar antígenos às NK (MIURA et al., 2010).

As células de Langerhans ao serem expostas à proteína L1 apresentam tolerância aos antígenos (FAUSCH et al., 2005). Com a persistência da infecção viral, há a ativação da imunidade adaptativa. Apesar de a resposta mediada por células B induzir uma proteção vacinal eficiente, com produção de células de memória e proteção de longo prazo, ela é inefetiva para remissão de infecções estabelecidas (SCHERER et al., 2014; STANLEY, 2010).

A resposta imune por linfócitos T acontece quando uma APC consegue capturar um antígeno viral. Ao digerir esse antígeno, a célula se desloca para o linfonodo e expõe o peptídeo viral pelas moléculas de MHC-II. Assim que esse sinal é reconhecido por um linfócito T CD4+ *naive*, se inicia a resposta imune celular. O linfócito se diferencia em uma célula T auxiliar Th1 ou Th2, enquanto os macrófagos e células dendríticas são ativados. Finalmente, as proteínas ativadoras de inflamação são liberadas. Por apresentação-cruzada, o linfócito T CD8+ *naive* reconhece o antígeno viral no MHC-I na superfície da APC e se diferencia em célula T citotóxica, conseguindo reconhecer células epiteliais que apresentam o antígeno viral em sua superfície ou que os liberem. Na infecção pelo HPV, o mecanismo de ativação da resposta imune é reduzido pela ação das suas proteínas e conseqüentemente há redução de células APCs, dificultando a ação dos linfócitos (SASAGAWA; TAKAGI & MAKINODA, 2012; STANLEY; STERLING, 2014).

O vírus ainda possui outros mecanismos próprios para se esquivar da resposta imune. Seu ciclo é não lítico e sua expressão de proteínas acontece em baixa quantidade, geralmente não sendo excretadas. Assim seus vírions são liberados de maneira concomitante à descamação celular, não apresentando viremia nem inflamação e sendo percebidos pelo sistema imune apenas quando já se encontram na superfície do epitélio. Além disso, ele pode tanto alterar a expressão dos genes da célula quanto substituir suas próprias sequências e códonos incomuns por comuns a mamíferos, sem alterar sua funcionalidade. Sua infecção intraepitelialmente restrita acarreta antígenos virais pouco expostos e inibição da ação de APCs (STANLEY, 2010; CONSOLARO; MARIA-ENGLER, 2012).

## 1.5 TRATAMENTO

Segundo o Sistema Bethesda, usado para reportar a citologia cervical, uma lesão escamosa intraepitelial é marcada pela divisão anormal das células do epitélio. Quando as lesões são pouco alteradas em relação ao tecido normal recebe o nome de *low-grade squamous intraepithelial lesion* (LSIL). Na ocorrência de lesões com células bastante anormais ao microscópio, essas são chamadas de HSIL (*high-grade squamous intraepithelial lesion*). Células provenientes de divisões atípicas com significado indeterminado, ainda não suficientes para caracterizar uma lesão, recebem o nome de ASC-US (*atypical squamous cells of undetermined significance*). Lesões as quais não se pode afastar nem confirmar o grau de anormalidade recebem são denominadas ASC-H (*atypical squamous cells cannot exclude HSIL*) (SOLOMON et al., 2002).

No Brasil, o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde é pautado pelo diagnóstico citopatológico e dependente da faixa etária. Em lesões cervicais de baixo grau, como ASC-US ou LSIL, a recomendação é de repetição do exame citopatológico, posterior a um período de 24 meses nas pacientes com menos de 25 anos e a 6 meses para aquelas acima de 25 anos, seguido de uma colposcopia em caso de contínua positividade. Para pacientes com lesões intraepiteliais de alto grau, como HSIL, prevalece a indicação da prática conhecida como “Ver e Tratar” na qual, durante a realização da colposcopia e partindo da confirmação visual de alterações com características celulares anormais no colo do útero, se aplica imediatamente uma

das técnicas ablativas ou excisionais, como a cirurgia de alta frequência e a conização (INCA (BRASIL), 2016). Apesar de efetivas, ambas são técnicas invasivas e inespecíficas que promovem a retirada de uma porção do colo uterino, sem especificidade pelas infectadas por HPV.

O tratamento para as lesões pré-cancerosas gera altos custos para o sistema de saúde e riscos para as pacientes. Há possibilidade de sequelas a longo prazo para a paciente, como uma possível relação com infertilidade, aumento do risco de partos prematuros e uma piora no quadro de uma pequena porcentagem de pacientes, causada pela incompleta remoção das células infectadas (MORTENSEN; LARSEN, 2010; NOVAES et al. 2015; KYRGIU et al., 2017).

## 1.6 VACINAS

### 1.6.1 Vacinas profiláticas

As vacinas disponíveis no mercado e liberadas pelo FDA (Food and Drugs Administration) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) contra HPV são baseadas na indução de anticorpos neutralizantes contra as proteínas do capsídeo. A primeira vacina foi licenciada em 2006, denominada Gardasil® e produzida pela Merck Sharp Dohme, utilizando proteínas recombinantes L1 de HPV 6, 11, 16 e 18 expressas em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PAAVONEN et al., 2007; DE SANJOSE et al., 2010). A Cervarix®, foi licenciada em 2008 e é produzida pela Glaxo Smith Kline, constituída por proteínas L1 recombinantes de HPV 16 e 18 que são expressas em culturas de células de inseto, SF9 (PAAVONEN et al., 2007; MOUCHET et al., 2018). Em 2014 o FDA aprovou a vacina nonavalente Gardasil-9®, formulada com partículas de L1 de 9 diferentes tipos de HPV: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Todas essas vacinas se provaram eficazes e seguras para uma parte da população (KOROMILAS; LI & MATLASHEWSKI, 2001; CAPRA et al., 2017).

Contudo, as vacinas profiláticas não possuem efetividade na remissão de lesões, não apresentam evidência de eficácia em pessoas que já tiveram contato com o vírus e parecem não oferecer proteção para mulheres acima de 25 anos, fator de

grande preocupação quando estudos mostram a existência de um segundo pico de infecção em mulheres acima dos 40 anos (HILDESHEIM et al., 2016; ARBYN et al. 2018; SANJOSÉ et al., 2007). Países Latino-Americanos também têm enfrentado uma diminuição significativa em suas coberturas vacinais. Em parte, causada pela desinformação dos pais e responsáveis, que não possuindo informações corretas sobre a vacina, acreditam em efeitos adversos inexistentes ou que a vacinação pode encorajar uma vida sexual ativa, e em parte pela dificuldade de acesso a todas as doses necessárias para imunização (GATTEGNO et al. 2019; MENDES LOBÃO et al. 2018).

### **1.6.2 Vacinas Terapêuticas**

Objetivando encontrar uma forma de regredir ou controlar as lesões causadas pelo vírus, diversos esforços têm sido empregados na tentativa de desenvolver uma vacina com potencial terapêutico, entre elas as vacinas de vetor viral, proteínas e peptídeos, ácidos nucleicos, dentre outras. A maioria tem como alvo as oncoproteínas virais E6 e E7, buscando encontrar uma forma de melhor entregar essas proteínas para reconhecimento das células APCs. Há em estudo a tentativa de produzir vacinas proteicas a partir da fusão de diversas proteínas virais, como é o caso da TA-CIN. Uma sequência em tandem de proteínas de L2, E6 e E7 expressa em sistema de *E. coli* e testada em ensaios animais. Apesar de ter demonstrado bons resultados em fases pré-clínicas e fase I, em fases seguintes a resposta de anticorpos anti-L2 ocorreu por curto tempo, obtendo sucesso em induzir respostas anti-E6 e anti-E7 em células T. Novas técnicas, como aplicação no local da lesão, e uso de diversos adjuvantes têm sido testados na tentativa de induzir uma resposta de longo prazo (KARANAM et al., 2009; PENG et al. 2015).

A vacina de peptídeos é também uma das candidatas que têm sido estudada e se provou estável, segura, com baixas reações adversas e maior facilidade de produção em larga escala. Sua pequena sequência de aminoácidos facilita o manejo industrial e possibilita diferentes combinações sem os riscos da utilização de oncoproteínas completas. Entretanto, esses peptídeos apresentam ineficiência na ativação efetiva da resposta imune, obstáculo para o qual os métodos *in silico* e a utilização de adjuvantes têm sido empregados na tentativa de contornar (LIU et al.,

2012; HANCOCK; HELLNER; DORRELL, 2018; NAMVAR et al., 2019). Vacinas de peptídeos encontram-se em fase de testes I ou II, como a ISA101 que é uma vacina de peptídeos sintéticos longos (SLP) que possui um mix de 9 peptídeos das proteínas E6 e E7 e adjuvante (Montanide<sup>TM</sup> ISA-51). Seus resultados têm mostrado de uma forte resposta de células T e, em um esquema tri-terapia com combinação de quimioterápicos e tratamento imunestimulante local, a remissão e eliminação de tumores cervicais em modelo animal (DOMINGOS-PEREIRA et al., 2019).

## 2. CONCLUSÃO

Com as análises *in silico* feitas nesse trabalho foi possível prever e selecionar epítomos das proteínas E6 e E7 de HPV-16 e HPV-18 que se mostraram capazes de ativar células TCD4+ e TCD8+ através da ligação com o complexo principal de histocompatibilidade. O objetivo é a produção de uma vacina terapêutica em multi-epítomos baseada nessas análises.

As estratégias de predição e seleção de peptídeos validadas *in silico* mostraram-se eficazes para a obtenção de diversos epítomos com potencial de ativação da resposta imune, considerando também o potencial de imunogenicidade, toxicidade e alergenicidade, além de uma validação da seleção pela predição de ligação molecular entre as estruturas de epítomos virais e moléculas de HLA. Por fim, este trabalho resultou na seleção de 26 epítomos ao total, sendo 8 provenientes da proteína E6 de HPV-16, 8 da proteína E6 de HPV-18, 6 provenientes da proteína E7 de HPV-16 e 5 provenientes da proteína E7 de HPV-18.

### 3 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015 *Advances in Physiology Education*. Published by **American Physiological Societ**.

ANDREATTA, Massimo; NIELSEN, Morten. Sequence analysis Gapped sequence alignment using artificial neural networks : application to the MHC class I system. v. 32, n. October 2015, p. 511–517, 2016.

ARBYN, Marc et al. Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2018, n. 5, 2018.

ASHRAFI, G. Hossein et al. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 9, p. 2105–2112, 2006.

BERGANT, Martina; BANKS, Lawrence. SNX17 Facilitates Infection with Diverse Papillomavirus Types. **Journal of Virology**, v. 87, n. 2, p. 1270–1273, 2013.

BERGANT MARUŠIČ, Martina et al. Human Papillomavirus L2 Facilitates Viral Escape from Late Endosomes via Sorting Nexin 17. **Traffic**, v. 13, n. 3, p. 455–467, mar. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0854.2011.01320.x>>.

BERGVALL, Monika; MELENDY, Thomas; ARCHAMBAULT, Jacques. The E1 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 35–56, 2013.

BIENKOWSKA-HABA, Malgorzata; PATEL, Hetalkumar D.; SAPP, Martin. Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 7, 2009.

BLASZCZYK, Maciej et al. Modeling of protein-peptide interactions using the CABS-dock web server for binding site search and flexible *docking*. **Methods**, v. 93, n. 2015, p. 72–83, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.07.004>>.

BODENHOFER, Ulrich et al. msa: an R package for multiple sequence alignment. **Bioinformatics**, p. btv494, 26 ago. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btv494>>.

BOSCH, F. Xavier et al. Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. **Vaccine**, v. 31, p. H1–H31, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.003>>.

BRISSON, Marc et al. Impact of HPV vaccination and cervical screening on cervical cancer elimination: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 575–590, 2020.

BRUNI L, ALBERO G, SERRANO B, MENA M, COLLADO JJ, GÓMEZ D, MUÑOZ J, BOSCH FX, DE SANJOSÉ S. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. **Summary Report**. 22 October 2021.

BUI, Huynh Hoa et al. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 7, p. 1–5, 2006.

CALIS, Jorg J.A. et al. Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 10, 2013.

CALTON, Christine M. et al. Translocation of the papillomavirus L2/vDNA complex across the limiting membrane requires the onset of mitosis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. 1–29, 2017.

CAPRA, Giuseppina et al. Potential impact of a nonavalent HPV vaccine on HPV related low-and high-grade cervical intraepithelial lesions: A referral hospital-based study in Sicily. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 13, n. 8, p. 1839–1843, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1319026>>.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Human Papillomavirus Human Papillomavirus. **Pink Book**, p. 175–186, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/hpv.pdf>>.

CHEN, Xiaoying; ZARO, Jennica L.; SHEN, Wei Chiang. Fusion protein *linkers*: Property, design and functionality. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 10, p. 1357–1369, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>>.

COLPANI, Verônica et al. **Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis**. [S.l.: s.n.], 2020. v. 15.

CONSOLARO, M. E. L.; MARIA-ENGLER, S. A. (Orgs.). Citologia clínica cérvico-vaginal: texto e atlas. São Paulo: **Roca**, 2012. 279 p.

CROSBIE, Emma J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 382, n. 9895, p. 889–899, 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7)>.

DAY, Patricia M. et al. Identification of a Role for the trans -Golgi Network in Human Papillomavirus 16 Pseudovirus Infection . **Journal of Virology**, v. 87, n. 7, p. 3862–3870, 2013.

DE SANJOSE, Silvia et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 11, p. 1048–1056, 2010.

DE VILLIERS, Ethel Michele et al. **Classification of papillomaviruses**. **Virology**. [S.l.: s.n.], 2004

DIMAIO, Daniel; PETTI, Lisa M. The E5 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 99–114,

2013.

DIMITROV, Ivan; FLOWER, Darren R; DOYTCHINOVA, Irini. AllerTOP - a server for *in silico* prediction of allergens. v. 14, n. Suppl 6, 2013.

DOMINGOS-PEREIRA, Sonia et al. intravaginal CpG as tri-therapy towards efficient regression of genital HPV16 tumors. **Journal for Immuno Therapy of Cancer**, v. 1, p. 1–7, 2019.

DOORBAR, John et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, n. S1, p. 2–23, 2015.

DOORBAR, John; QUINT, Wim; BANKS, Lawrence; BRAVO, Ignacio G.; STOLER, Mark; BROKER, Tom R.; STANLEY, Margaret A.. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, n. SUPPL.5, p. F55–F70, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>>.

DOYTCHINOVA, Irini A; FLOWER, Darren R. VaxiJen : a server for prediction of protective antigens , tumour antigens and subunit vaccines. v. 7, p. 1–7, 2007.

DU, Xing et al. Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1–34, 2016.

FAUSCH, Steven C. et al. Human Papillomavirus Can Escape Immune Recognition through Langerhans Cell Phosphoinositide 3-Kinase Activation. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 11, p. 7172–7178, 2005.

GASTEIGER, Elisabeth et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 2003.

GATTEGNO, Mariana V. et al. A cross-sectional survey of parental attitudes towards Human papillomavirus vaccination exclusion categories in Brazil. **BMC International Health and Human Rights**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019.

GRAHAM, Sheila V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical Science**, v. 131, n. 17, p. 2201–2221, 2017. Disponível em: <<http://clinsci.org/lookup/doi/10.1042/CS20160786>>.

GREENBAUM, Jason et al. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. **Immunogenetics**, v. 63, n. 6, p. 325–335, 9 jun. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

GUPTA, Sudheer et al. *In silico* Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. v. 8, n. 9, 2013.

HANCOCK, Gemma; HELLNER, Karin; DORRELL, Lucy. Therapeutic HPV vaccines. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 59–72, fev. 2018. Disponível em:



<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693417301414>>.

HARDEN, Mallory E.; MUNGER, Karl. **Human papillomavirus molecular biology. Mutation Research - Reviews in Mutation Research**. [S.l.: s.n.], 2017

HEBNER, Christy M.; LAIMINS, Laimonis A. Human papillomaviruses: Basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Reviews in Medical Virology**, v. 16, n. 2, p. 83–97, 2006.

HERFS, M. et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. 10516–10521, 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1202684109>>.

HILDESHEIM, Allan et al. Impact of human papillomavirus (HPV) 16 and 18 vaccination on prevalent infections and rates of cervical lesions after excisional treatment. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 215, n. 2, p. 212.e1-212.e15, 2016.

HONG, Shiyuan; LAIMINS, Laimonis A. Regulation of the life cycle of HPVs by differentiation and the DNA damage response. **Future Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1547–1557, 2013.

HOPPE-SEYLER, Karin et al. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. **Trends in Microbiology**, v. xx, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.007>>.

HUSSEIN, Waleed M. et al. Multiantigenic peptide–polymer conjugates as therapeutic vaccines against cervical cancer. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4372–4380, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.07.036>>.

INCA (BRASIL). MINISTÉRIO DA SAÚDE/INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Diretrizes Brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. [S.l.: s.n.], 2016. v. XXXIII. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento\\_cancer\\_colo\\_uteropdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento_cancer_colo_uteropdf)>.

KARANAM, Balasubramanyam et al. Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity. **Vaccine**, v. 27, n. 7, p. 1040–1049, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.099>>.

KOROMILAS, Antonis E.; LI, Suiyang; MATLASHEWSKI, Gregory. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 12, n. 2–3, p. 157–170, 2001.

KYRGIYOU, Maria et al. Obstetric outcomes after conservative treatment for cervical intraepithelial lesions and early invasive disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 11, 2 nov. 2017. Disponível em: <[www.cochranelibrary.com](http://www.cochranelibrary.com)>.

LARSEN, Mette V. et al. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 1–12, 2007.

LAZARCZYK, Maciej et al. Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 1, p. 35–42, 2008.

LEE, Hasup et al. GalaxyPepDock: A protein-peptide *docking* tool based on interaction similarity and energy optimization. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W431–W435, 2015.

LI, Fuyi et al. Procleave: Predicting Protease-specific Substrate Cleavage Sites by Combining Sequence and Structural Information. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 52–64, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2019.08.002>>.

LIPOVSKY, Alex et al. The cellular endosomal protein stannin inhibits intracellular trafficking of human papillomavirus during virus entry. p. 2821–2836, 2017.

LIU, Tzu-Yu et al. Advances in Peptide-based Human Papillomavirus Therapeutic Vaccines. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 14, p. 1581–1592, 2012.

LIU, Xuefeng et al. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 44, p. 18780–18785, 3 nov. 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0906357106>>.

LIVINGSTON, Brian et al. A Rational Strategy to Design Multiepitope Immunogens Based on Multiple Th Lymphocyte Epitopes. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 11, p. 5499–5506, 2002.

LONGWORTH, Michelle S; LAIMINS, Laimonis A. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. v. 68, n. 2, p. 362–372, 2004.

MA, Barbara et al. Emerging human papillomavirus vaccines. **Expert opinion on emerging drugs**, v. 17, n. 4, p. 469–92, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23163511>>.

MCBRIDE, Alison A. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 57–79, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.006>>.

MENDES LOBÃO, William et al. Low coverage of HPV vaccination in the national immunization programme in Brazil: Parental vaccine refusal or barriers in health-service based vaccine delivery? **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1–14, 2018.

MENEZES TELES E OLIVEIRA, Deylane et al. pHLA3D: An online database of predicted three-dimensional structures of HLA molecules. **Human Immunology**, v. 80, n. 10, p. 834–841, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.06.009>>.

MIDDLETON, Kate et al. Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10186–10201, 2003.

MITTAL, Suruchi; BANKS, Lawrence. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 23–35, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.08.001>>.

MIURA, Shiho et al. CD1d, a Sentinel Molecule Bridging Innate and Adaptive Immunity, Is Downregulated by the Human Papillomavirus (HPV) E5 Protein: a Possible Mechanism for Immune Evasion by HPV. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 11614–11623, 2010.

MOODY, Cary A.; LAIMINS, Laimonis A. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2886>>.

MORTENSEN, Gitte Lee; LARSEN, Helle K. Quality of life of homosexual males with genital warts: A qualitative study. **BMC Research Notes**, v. 3, 2010.

MOUCHET, Julie et al. Human papillomavirus vaccine and demyelinating diseases—A systematic review and meta-analysis. **Pharmacological Research**, v. 132, p. 108–118, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.04.007>>.

MUÑOZ, Nubia et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 2003.

NAMVAR, Ali et al. *In silico*/In vivo analysis of high-risk papillomavirus L1 and L2 conserved sequences for development of cross-subtype prophylactic vaccine. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–22, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-51679-8>>.

NARISAWA-SAITO, Mako; KIYONO, Tohru. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Science**, v. 98, n. 10, p. 1505–1511, 2007.

NGUYEN, Harrison P.; RAMÍREZ-FORT, Marigdalena K.; RADY, Peter L. The Biology of Human Papillomaviruses. **Virus Res.** [S.l.: s.n.], 2014. v. 231. p. 19–32. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Abstract/355959>>.

NIELSEN, Morten et al. MHC Class II epitope predictive algorithms. **Immunology**, v. 130, n. 3, p. 319–328, 2010.

NIELSEN, Morten; LUNDEGAARD, Claus; LUND, Ole; KEŞMİR, Can. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: Insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. **Immunogenetics**, v. 57, n. 1–2, p. 33–41, 2005.

NOMINÉ, Yves et al. Formation of Soluble Inclusion Bodies by HPV E6 Oncoprotein

Fused to Maltose-Binding Protein. **Protein Expression and Purification**, v. 23, n. 1, p. 22–32, out. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592801914512>>.

NOMOTO, Minoru et al. Analysis of 8-hydroxyguanine in rat kidney genomic DNA after administration of a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 5, p. 837–841, 1999.

NOVAES, Hillegonda Maria Dutilh et al. Annual national direct and indirect cost estimates of the prevention and treatment of cervical cancer in Brazil. **Clinics**, v. 70, n. 4, p. 289–295, 2015.

OZBUN, Michelle A. Extracellular events impacting human papillomavirus infections: Epithelial wounding to cell signaling involved in virus entry. **Papillomavirus Research**, v. 7, n. April, p. 188–192, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.04.009>>.

PAAVONEN, Jorma et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. **Lancet**, v. 369, n. 9580, p. 2161–2170, 2007.

PENG, Shiwen et al. Sequential cisplatin therapy and vaccination with HPV16 E6E7L2 fusion protein in saponin adjuvant GPI-0100 for the treatment of a model HPV16+ cancer. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–25, 2015.

PETERS, Björn et al. Identifying MHC Class I Epitopes by Predicting the TAP Transport Efficiency of Epitope Precursors. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 4, p. 1741–1749, 2003.

PYEON, Dohun et al. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 2, 2009.

RECHE, Pedro A.; REINHERZ, Ellis L. PEPVAC: A web server for multi-epitope vaccine development based on the prediction of supertypic MHC ligands. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. SUPPL. 2, p. 138–142, 2005.

SANAMI, Samira et al. Design of a multi-epitope vaccine against cervical cancer using immunoinformatics approaches. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-91997-4>>.

SANJOSÉ, S. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical HPV in women with normal cytology. **Lancet Infect**, v. 7, n. 7, p. 453–459, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597569>>.

SASAGAWA, Toshiyuki; TAKAGI, Hiroaki; MAKINODA, Satoru. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, n. 6, p. 807–815, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10156-012-0485-5>>.

SCHEFFNER, Martin et al. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 495–505, 1993.

SCHELHAAS, Mario et al. Entry of Human Papillomavirus Type 16 by Actin-Dependent, Clathrin- and Lipid Raft-Independent Endocytosis. v. 8, n. 4, 2012.

SCHERER, Erin M. et al. Characteristics of Memory B Cells Elicited by a Highly Efficacious HPV Vaccine in Subjects with No Pre-existing Immunity. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, 2014.

SCHILLER, John T.; DAY, Patricia M.; KINES, Rhonda C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. **Gynecologic Oncology**, v. 118, n. 1 SUPPL. 1, p. S12–S17, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.04.004>>.

SETTE, Alessandro; FIKES, John. Epitope-based vaccines: An update on epitope identification, vaccine design and delivery. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 4, p. 461–470, 2003.

SIX, Adrien et al. Systems biology in vaccine design. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 295–304, 2012.

SOLOMON, Diane et al. Human papillomavirus, Indigenous Paraguayan women, Genital infections, Cervical inflammation. **Journal of American Medical Association**, v. 287, n. 16, p. 2114–19, 2002.

SONGOCK, William K.; KIM, Seong man; BODILY, Jason M. The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. **Virus Research**, v. 231, p. 56–75, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.017>>.

SPANOS, W. C. et al. The PDZ Binding Motif of Human Papillomavirus Type 16 E6 Induces PTPN13 Loss, Which Allows Anchorage-Independent Growth and Synergizes with Ras for Invasive Growth. **Journal of Virology**, v. 82, n. 5, p. 2493–2500, 2008. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02188-07>>.

SPODEN, Gilles et al. Human Papillomavirus Types 16, 18, and 31 Share Similar Endocytic Requirements for Entry. v. 87, n. 13, p. 7765–7773, 2013.

STANLEY, Margaret. Potential mechanisms for HPV vaccine-induced long-term protection. **Gynecologic Oncology**, v. 118, n. 1 SUPPL. 1, p. S2–S7, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.04.002>>.

STANLEY, Margaret A.; STERLING, Jane C. Host responses to infection with human papillomavirus. **Current Problems in Dermatology (Switzerland)**, v. 45, p. 58–74, 2014.

SUNG, Hyuna et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

THOMPSON, Julie D.; HIGGINS, Desmond G.; GIBSON, Toby J. CLUSTAL W:

Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

THORLAND, Erik C et al. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. p. 1225–1237, 2003.

VELDERS, Markwin P. et al. Defined Flanking Spacers and Enhanced Proteolysis Is Essential for Eradication of Established Tumors by an Epitope String DNA Vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 9, p. 5366–5373, 2001.

WANG, Peng et al. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. **PLoS Computational Biology**, v. 4, n. 4, 2008.

WEISKOPF, Daniela et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, 2013.

WENDLAND, Eliana Marcia et al. Prevalence of HPV infection among sexually active adolescents and young adults in Brazil: The POP-Brazil Study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

XUE, Li C. et al. PRODIGY: A web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. **Bioinformatics**, v. 32, n. 23, p. 3676–3678, 2016.

ZUR HAUSEN, Harald. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

