

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**HELOISE RANUCCI LUCHIARI**

**Novos ligantes peptídicos das oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16:  
descoberta e aplicações no desenvolvimento de terapias para  
tumores induzidos por HPV**

- Versão corrigida -

Data do Depósito na SPG: **30/11/2022**

São Paulo

2022



HELOISE RANUCCI LUCHIARI

**Novos ligantes peptídicos das oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16:  
descoberta e aplicações no desenvolvimento de terapias para  
tumores induzidos por HPV**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutora em Ciências (Bioquímica)*

*Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Giordano  
Coorientadora: Profa. Dra. Luisa Lina Villa*

São Paulo

2022

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.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L936n Luchiari, Heloise Ranucci  
Novos ligantes peptídicos das oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16: descoberta e aplicações no desenvolvimento de terapias para tumores induzidos por HPV / Heloise Ranucci Luchiari. - São Paulo, 2022.  
126 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Giordano, Ricardo José  
Coorientador: Villa, Luisa Lina

1. HPV. 2. Oncoproteínas. 3. Peptídeos. 4. Câncer. 5. Terapia. I. T. II. Giordano, Ricardo José, orientador. III. Villa, Luisa Lina, coorientador.



Universidade de São Paulo  
**Instituto de Química**

"Novos ligantes peptídicos das oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16:  
descoberta e aplicações no desenvolvimento de terapias para  
tumores induzidos por HPV"

## **HELOISE RANUCCI LUCHIARI**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

---

Prof. Dr. Ricardo José Giordano  
(Orientador e Presidente)

**APROVADO(A) POR:**

---

Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères  
IQ - USP

---

Prof. Dr. Enrique Mario Boccoardo Pierulivo  
ICB - USP

---

Prof. Dr. Emmanuel Dias Neto  
HOSPITAL AC CAMARGO

SÃO PAULO  
10 de fevereiro de 2023

*Dedico esta tese a meus amados pais, Silvia e Mario,  
por todo amor e apoio.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Ricardo Giordano, por investir e acreditar em mim antes mesmo de me conhecer. Por se interessar pelo meu trabalho, por estar sempre atento aos experimentos, aos resultados e às dúvidas, por todas as ideias. Agradeço até mesmo pelas vezes em que discordamos, cresci muito com as argumentações. Obrigada por me proporcionar o maior delta de conhecimento de toda a minha história.

Agradeço à Dra. Luisa por me inspirar em todas as nossas conversas, por instigar o ânimo de fazer ciência, e ciência de qualidade! Por me deixar com a pulga atrás da orelha e me fazer sempre questionar. Agradeço por seu coração de ouro. Admiro demais a cientista, mas acima de tudo, a mulher que ela é.

Agradeço a todos do grupo do Laboratório de Bioquímica Combinatorial, aos que convivi menos tempo: André, Carlos, Fenny, Isabela, Luiza, Maria Luiza; e aos colegas de todos os dias: Lilian, Caio, Ed, Alessandra, Ariane, Erika e Luis. Cada um de vocês me ensinou muito e marcou a minha história. Obrigada, Luis, por me levar a questionar tudo todos os dias (até meu creme de cabelo), pelas risadas e por sempre tirar minhas placas da estufa. Vou sentir saudade. Obrigada, Erika, pelas conversas profundas e por me ensinar tanto (sobre a vida dentro e fora do laboratório).

Agradeço ao Instituto de Química por todas as oportunidades que me ofereceu, por todo o intercâmbio científico e os laboratórios de excelência. Agradeço aos funcionários Milton e Vanderlei, e principalmente à Célia Ludio, que além de toda a ajuda experimental, se tornou uma amiga querida. Agradeço à Profa. Dra. Carla Columbano pela oportunidade da monitoria, que além de divertida me mostrou o quanto gosto de ensinar.

Agradeço também aos amigos que fiz nas disciplinas da pós-graduação, em especial ao Alex Inague e à Lorena Rocha, que muitas vezes me ajudaram a enxergar a vida e as situações sob uma ótica muito melhor, escutaram meus lamentos e me deram apoio.

Agradeço ao grupo do INOVACANCER (Giana, Rafa, Gabi, Raquel, Dra. Lara Termini e todos) e à Dra. Laura e seu grupo de pesquisa, que me fizeram sentir bem-vinda, querida e acolhida. Por todo o intercâmbio científico nestes anos, o meu muito obrigada.

Agradeço em especial ao Dr. Ricardo Cintra, que me incentivou e me trouxe para este grupo inspirador, por todas as nossas conversas riquíssimas sobre a ciência e a vida.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento que possibilitou a realização deste trabalho (Processo CNPq nº 142168/2017-3, Processo FAPESP nº 2017/19801-4.)

Agradeço à minha mãe, Silvia, por toda acolhida e ombro amigo, pelos conselhos, pela conexão única que nós temos. Agradeço ao meu pai, Mario, por sempre estar interessado em ouvir mais um pouquinho sobre o que eu faço, ou sobre qualquer coisa aleatória que eu quisesse contar. Por sempre me receber bem na sexta-feira. Agradeço aos meus irmãos (e agregados), Laura (e Luiz Antônio) e João Silvestre (e Sarinha), por entenderem minhas ausências e me animarem nos tempos difíceis, por todos os memes, piadas internas e músicas engraçadas. Agradeço também ao Thiago, ao Miguel, à Maihla, ao Diogo e à Luíza, por completarem nosso círculo de amor. Família, vocês são a luz que guia meu caminho. Amo vocês.

Agradeço à tia Cida (*in memoriam*), que ensinou a todos nós como se alegrar e esperar pelas coisas mais simples da vida.

Agradeço à vó Daisy, sempre curiosa e atenta, que todos os dias me inspira a ser a cientista, a professora e a neta que ela merece. Espero um dia chegar lá.

Um agradecimento especial ao Alberto, meu amor, meu cais nos tempos difíceis, pela sua paciência, por entender minhas ausências e me apoiar tanto na conquista desse sonho. Eu amo você. Agradeço a sua família maravilhosa: Dona Nilda, Sr. Valdemar, Lourdes, Ademar, Gabriel, Gustavo, Karina, Vó Olivia, tio Rinaldo, Wellington, Vanessa, Alice... Por todo o acolhimento e apoio que sempre me dão. Vocês são minha família também.

Agradeço à Mariana, amiga da vida toda. Não importa a distância, a tempestade, nosso barco nunca vira.

Agradeço à UNINOVE e meus colegas professores, por todo o convívio, brincadeiras e ajuda. Agradeço também e especialmente aos meus alunos, com os quais eu aprendo todos os dias, principalmente sobre mim mesma e sobre a pessoa que eu quero ser.

E agradeço, acima de tudo, a Deus, por me conceder a sabedoria, os dons e a força para chegar até aqui.

*“You do not just wake up and become the butterfly. Growth is a process.”*

Rupi Kaur

## RESUMO

(Luchiari, H.R.) **Novos ligantes peptídicos das oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16: descoberta e aplicações no desenvolvimento de terapias para tumores induzidos por HPV.** 2022. 126p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O papilomavírus humano (HPV) é responsável por aproximadamente 700 mil novos casos de câncer anualmente, além de muitas infecções assintomáticas que podem progredir para lesões benignas, pré-malignas e malignas. Apesar da alta eficácia da vacina profilática em prevenir a infecção, ela não possui efeito terapêutico e, até o momento, não existem fármacos específicos para o tratamento de indivíduos infectados pelo HPV. As oncoproteínas E6 e E7, codificadas a partir do genoma viral, são capazes de se ligar a diversos alvos celulares e são essenciais para a transformação e manutenção do fenótipo maligno na carcinogênese mediada pelo HPV. Sabe-se que estas proteínas não possuem similaridade com proteínas celulares e que seu silenciamento leva as células infectadas à apoptose, tornando-as alvos promissores para o desenvolvimento de novas terapias. Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar ligantes peptídicos das oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16, o tipo viral mais prevalente nos tumores, que pudessem ser utilizados para o desenvolvimento de tratamentos específicos para a tumorigênese e infecção por HPV. Utilizando a tecnologia de *phage display* e bibliotecas construídas em nosso laboratório, foram encontradas sequências peptídicas inéditas que reconhecem E6 e E7. Os peptídeos selecionados contra a E6 mostraram-se altamente específicos e compartilharam um motivo central com características físico-químicas semelhantes, composto por resíduos ácidos flanqueados por resíduos hidrofóbicos. A ligação dos peptídeos ao bolso hidrofóbico da E6, reconhecido por diversos alvos celulares desta oncoproteína, foi validado por abordagens experimentais e análises *in silico*. Os peptídeos sintéticos foram testados em linhagens celulares de tumores HPV-positivos, mas não demonstraram capacidade de internalização ou efeito sobre a viabilidade celular. A ligação peptídeo-oncoproteína foi então utilizada para o desenvolvimento de um ensaio de varredura de banco de pequenos compostos, resultando em dois compostos com atividade sobre a viabilidade celular de linhagens tumorais HPV-positivas. Estes compostos podem ser otimizados para o desenvolvimento de inibidores de E6, além do próprio ensaio poder ser utilizado como base para a varredura de outros bancos de compostos. Ademais, as análises de *docking* e as simulações de dinâmica molecular evidenciaram novas interações entre o peptídeo identificado neste estudo e a E6, fornecendo ferramentas para o desenho racional de inibidores da oncoproteína. Estes achados contribuirão para a evolução do tratamento, visando beneficiar os milhares de pacientes que sofrem com lesões e tumores induzidos pela infecção por HPV.

Palavras-chave: HPV. Oncoproteínas. Peptídeos. Câncer. Terapia.

## ABSTRACT

(Luchiari, H.R.) **New peptide binders for HPV16 E6 and E7 oncoproteins: identification and application in the development of therapies for HPV-induced tumors.** 2022. 126p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The Human papillomavirus (HPV) is responsible for almost 700,000 new cancer cases annually, and for many asymptomatic infections that can progress to benign, pre-malign and malignant lesions. Although the prophylactic HPV vaccines can prevent new infections, it does not benefit already infected individuals and there is no specific treatment for them. The E6 and E7 oncoproteins, encoded by the viral genome, hijack several cellular targets and are essential to achieve and maintain the malignant phenotype in HPV-induced tumors. E6 and E7 have no homology with cellular proteins and its silencing can lead cells to apoptosis, making them optimal targets for the development of new therapies to fight HPV. Thus, the aim of this study was to identify inhibitory peptide ligands for E6 and E7 oncoproteins of the highly prevalent HPV 16 that can be useful for the development of new specific treatments for HPV tumorigenesis and infection. Using phage display technology and our own libraries, we found novel peptide binders for E6 and E7. Peptides selected against E6 were highly specific and shared a central motif with an acidic core flanked by hydrophobic residues. Also, the new E6 binders were able to bind to the hydrophobic pocket of the oncoprotein, previously described as the binding pocket for many cellular partners of E6. This result was validated by experimental and *in silico* approaches. Also, the novel peptides were tested in HPV-positive cancer cell lines, but they had no effects on cell viability. Thus, we developed a displacement screening platform based on the peptide-oncoprotein interaction to search for small compounds that bind to E6. Using this assay, we selected two compounds with effects on HPV-positive cell lines viability that can be optimized to the development of new HPV-specific therapies. It can also be useful to the screening of other molecules to find potential binders for E6. Moreover, docking and molecular dynamic simulations shed light on novel interactions between our peptide and E6, providing tools for rational design of new drugs. We hope that this work brings contribution to the development of specific treatments to benefit patients that suffer from lesions and tumors induced by HPV infection.

Keywords: HPV. Oncoproteins. Peptides. Cancer. Therapy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação dos genótipos de HPV.....	21
Figura 2 – O genoma do HPV16.....	23
Figura 3 – A infecção pelo HPV.....	24
Figura 4 – Modelo conceitual da progressão da infecção por HPV no colo do útero.....	31
Figura 5 – A tecnologia de <i>Phage display</i> .....	33
Figura 6 – Desenho esquemático da construção dos <i>pools</i> para <i>screening</i> do “ <i>Pandemic Response Box</i> ”.....	55
Figura 7 – Clonagem de E6 e E7.....	58
Figura 8 – Expressão, solubilidade e purificação das proteínas E6 e E7.....	60
Figura 9 – Expressão, solubilidade e purificação de GST-E6 e GST.....	61
Figura 10 – Detecção de GST-E6 e E7 por anticorpos específicos e confirmação da biotilação de E7 e GST.....	62
Figura 11 – Seleção de ligantes para a oncoproteína E6.....	64
Figura 12 – Seleção de peptídeos ligantes para a oncoproteína E7.....	65
Figura 13 – Especificidade de ligação de fagos selecionados por <i>phage display</i> à GST-E6 por ensaio de ligação.....	66
Figura 14 – Especificidade de ligação de fagos selecionados por <i>phage display</i> à E7 por ensaio de ligação.....	67
Figura 15 – Especificidade de ligação de fagos selecionados por <i>phage display</i> à GST-E6 por ensaio de competição.....	68
Figura 16 – Especificidade de ligação de fagos selecionados por <i>phage display</i> à GST-E6 ensaio de competição.....	68
Figura 17 – Curva dose-resposta da competição dos peptídeos A2 e A10 com seus fagos correspondentes pela ligação à GST-E6.....	69
Figura 18 – Competição cruzada entre os fagos A2 e A10 e os peptídeos pela ligação à GST-E6.....	70
Figura 19 – Deleções dos domínios da proteína E6.....	71
Figura 20 – Deleção da sequência gênica dos domínios de E6.....	72
Figura 21 – Expressão e Purificação dos domínios de E6.....	73

Figura 22 – Ensaio de ligação dos fagos A2 e A10 à GST-E6 com deleções.....	74
Figura 23 – Modelo da proteína E6 com N e C-terminais completos.....	75
Figura 24 – Análise e modelos estruturais do peptídeo A2 gerados pela ferramenta <i>PEP-FOLD3</i> .....	76
Figura 25 – Análise e modelos estruturais do peptídeo A10 gerados pela ferramenta <i>PEP-FOLD3</i> .....	76
Figura 26 – Comparação entre as estruturas de ligantes de E6 descritas e os modelos gerados no <i>docking</i> molecular do peptídeo A2 na proteína E6.....	78
Figura 27 – Interações dos resíduos do peptídeo A2 com a proteína E6.....	79
Figura 28 – Estabilidade geral da proteína E6 e do peptídeo A2 durante a simulação de dinâmica molecular.....	80
Figura 29 – Estrutura helicoidal do peptídeo A2 ao longo da simulação de dinâmica molecular.....	80
Figura 30 – Estabilidade das poses de ligação do peptídeo A2 durante a simulação de dinâmica molecular.....	81
Figura 31 – Resíduos da proteína E6 preditos nas interações com o peptídeo A2 conservados entre os HPV de alto risco oncogênico, mas não entre os de baixo risco.....	84
Figura 32 – Internalização dos peptídeos na linhagem celular C33a.....	85
Figura 33 – Internalização dos peptídeos na linhagem celular SiHa.....	86
Figura 34 – Internalização de peptídeos na linhagem C33a.....	87
Figura 35 – Internalização de peptídeos na linhagem SiHa.....	88
Figura 36 – Atividade metabólica de células tratadas com os peptídeos FITC-A2, FITC-Pen-A2 e FITC-A10.....	89
Figura 37 – Linhagens C33a e SiHa em cultura com administração de peptídeos.....	89
Figura 38 – Competição do peptídeo A2 fusionado à penetratina com o fago A2 pela ligação à GST-E6.....	91
Figura 39 – Atividade metabólica de linhagens celulares tratadas com o peptídeo PenA2.....	91
Figura 40 – Atividade metabólica de linhagens celulares tratadas com o peptídeo PenA2.....	92
Figura 41 – Ensaio de competição do fago A2 com compostos da placa E pela ligação à GST-E6.....	94

Figura 42 – Ensaio de competição do fago A2 com compostos da placa E pela ligação à GST-E6.....	94
Figura 43 – Ensaio de competição do fago A10 com pools e compostos da placa E pela ligação à GST-E6.....	95
Figura 44 – Compostos do “ <i>Pandemic Response Box</i> ” com potencial para inibição da atividade da proteína E6.....	96
Figura 45 – Atividade metabólica de linhagens celulares tratadas com os compostos do “ <i>Pandemic Response Box</i> ”.....	97
Figura 46 – Atividade metabólica de linhagens celulares tratadas com os compostos do “ <i>Pandemic Response Box</i> ”.....	97
Figura 47 – Ensaio de competição do fago A2 com <i>pool</i> de compostos da placa A pela ligação à GST-E6.....	120
Figura 48 – Ensaio de competição do fago A2 com <i>pool</i> de compostos da placa B pela ligação à GST-E6.....	121
Figura 49 – Ensaio de competição do fago A2 com <i>pool</i> de compostos da placa C pela ligação à GST-E6.....	122
Figura 50 – Ensaio de competição do fago A2 com <i>pool</i> de compostos da placa D pela ligação à GST-E6.....	123
Figura 51 – Ensaio de competição do fago A2 com <i>pool</i> de compostos da placa E pela ligação à GST-E6.....	124
Figura 52 – Ensaio de competição do fago A2 com compostos da placa E pela ligação à GST-E6.....	125

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Incidência mundial de casos de câncer totais e atribuíveis à infecção por HPV.....	19
Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho.....	57
Tabela 3 – Descrição dos clusters provenientes do <i>docking</i> molecular do peptídeo A2 no bolso de ligação <i>LxxLL</i> da oncoproteína E6.....	77
Tabela 4 – Principais interações entre resíduos de A2 e E6.....	82
Tabela 5 – Comparação das interações entre E6 e o peptídeo A2 com as interações entre E6 e outros peptídeos com o motivo <i>LxxLL</i> .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
AKT	<i>Ak strain transforming</i> , transformadora de cepa Ak, também conhecida como proteína quinase B
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , análise de variância
Arg	Arginina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , Coleção americana de tipos de cultura
ATM	<i>Ataxia-Telangiectasia Mutated protein</i> , proteína mutada em ataxia-telangiectasia
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein</i> , proteína relacionada a ataxia-telangiectasia e Rad3
BAK	<i>BCL2 Antagonist/Killer</i> , proteína de morte antagonista de BCL2
BAX	<i>BCL2 Associated X protein</i> , proteína X associada a BCL2
BCL2	<i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i> , Leucemia linfóide crônica de célula B / Linfoma 2
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albumina sérica bovina
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> , quinase dependente de ciclina
C-terminal	Carboxi-terminal
CUL2	<i>Cullin 2</i> , culina 2
Cys	Cisteína
DO	Densidade óptica
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , meio de cultivo eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA-metiltransferase
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i> , deoxinucleotídeos trifosfatados
E	<i>Early</i> , precoce
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E6	<i>Early protein 6</i> , proteína precoce 6
E6AP	<i>E6-Associated protein</i> , proteína associada à E6
E7	<i>Early protein 7</i> , proteína precoce E7
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , ácido etilendiamino tetra-acético
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> , receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> , quinase regulada por sinal extracelular
EUA	Estados Unidos da América
F	<i>Forward</i> , frente
R	<i>Reverse</i> , avesso
FADD	<i>Fas Associated Via Death Domain</i> , domínio associado à via de morte Fas
FAS	<i>Fas Cell Surface Death Receptor</i> , receptor de morte de superfície celular Fas
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isotianato de fluoresceína
fs	fentossegundo
Gln	Asparagina
GSK	GlaxoSmithKline
GST	Glutathione-S-transferase
HAC	Histona-acetilase

HDAC	Histina-deacetilase
hDLG	<i>human Drosophila Disc Large tumor suppressor homolog</i> , homólogo humano do suppressor de tumor disco largo de <i>Drosophila</i>
HDM	Histona-demetilase
His	Histidina
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , antígeno leucocitário humano
HPV	<i>Human papillomavirus</i> , papilomavírus humano
Hr-HPV	<i>High-risk human papillomavirus</i> , papilomavírus humano de alto risco oncogênico
hSCRIB	<i>Scribbled Planar Cell Polarity Protein</i> , proteína de polaridade celular <i>Scribbled</i>
hTERT	<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i> , transcriptase reversa telomerase humana
IC <sub>50</sub>	<i>Half-maximal inhibitory concentration</i> , concentração inibitória média
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
IRF3	<i>Interferon Regulatory Factor 3</i> , fator regulador de interferon 3
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
kV	Quilovolts
L	<i>Late</i>
LB	Luria-Bertani
LCR	<i>Long Control Region</i> , região longa controladora
Lys	Lisina
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i> , medicamentos para empreender contra a malária
MWCO	<i>Molecular weight cutoff</i> , corte de peso molecular
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanogramas
Ni <sup>2+</sup>	Íon Níquel
nM	nanomolar
NOTCH	<i>Neurogenic Locus Notch Homolog Protein</i> , proteína homóloga ao locus neurogênico Notch
ns	nanossegundo
N-terminal	Amino-terminal
pb	pares de bases
PBM	<i>PDZ Binding Motif</i> , motivo ligante de PDZ
PBS	<i>Phosphate Saline Buffer</i> , Tampão salina fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i> , Banco de dados de proteína

PDZ	<i>Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and Zonula occludens-1 protein (zo-1) domain</i> , domínio de proteína de densidade pós-sináptica, de DLG e de <i>Zonula occludens</i>
PEG	Polietilenoglicol
CARAC	Cisteína – Alanina – Arginina – Alanina–Cisteína
Pen	Penetratina
PFA	Paraformaldeído
pH	<i>Potential hydrogen</i> , potencial hidrogeniônico
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate 3-Kinase</i> , fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato 3 quinase
PI3KCA	<i>Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha Isoform</i> , isoforma da subunidade catalítica alfa da fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato 3 quinase
PM	Peso Molecular
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> ; Fluoreto de fenilmetilsulfonil
pRb	<i>Retinoblastoma-Associated Protein</i> , proteína associada ao retinoblastoma
PTEN	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i> , proteína homóloga de fosfatase e tensina
RAD51	<i>RecA Homolog, E. Coli, protein 51</i> , proteína 51 homóloga à recombinase A de <i>E.coli</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene</i> , proto-oncogene viral de sarcoma de rato
RMSD	<i>Root-mean-square deviation of atomic positions</i> , desvio quadrático médio entre as posições dos átomos
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , erro padrão da média
Ser	Serina
SFB	Soro Fetal Bovino
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> , meio de cultivo super ótimo com repressão catabólica
TA	Temperatura Ambiente
TPI	Tampão Intracelular
tRNA	<i>Transfer RNA</i> , RNA transportador
TU	<i>Transducing Units</i> , unidades transdutoras
Tyr	Tirosina
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , fator de crescimento endotelial vascular
VLP	<i>Virus-like particles</i> , partículas semelhantes a vírus
WNT	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family</i> , proteína da família de sítios de integração MMTV tipo Wingless
WST-1	<i>Water-soluble tetrazolium salt – 1</i> , sal tetrazólico solúvel em água
x	vezes
xg	<i>G-force</i> , força G (gravitacional)
Zn <sup>2+</sup>	Íon zinco
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de zinco

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 O impacto da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e das patologias associadas.....	19
1.2 O papilomavírus humano (HPV).....	21
1.3 As proteínas precoces codificadas pelo HPV.....	24
1.4 E6 e E7: as oncoproteínas dos hr-HPV e seus alvos celulares.....	25
1.5 A persistência da infecção pelo HPV, a expressão das oncoproteínas e o desenvolvimento de neoplasias.....	29
1.6 Busca de novos ligantes utilizando a tecnologia de <i>phage display</i> .....	32
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 Clonagem dos genes E6 e E7 para expressão em sistema bacteriano.....	35
3.2 Expressão heteróloga das oncoproteínas virais E6 e E7.....	37
3.3 Purificação das proteínas E6, E7, GST e GST-E6, por cromatografia de afinidade.....	38
3.4 Otimização do protocolo de expressão e purificação da proteína GST-E6.....	40
3.5 Ensaio de detecção das proteínas E6 e E7 com anticorpos específicos por F-LISA....	41
3.6 Biotinilação de E7 e GST e detecção por F-LISA.....	42
3.7 Seleção de peptídeos ligantes de GST-E6 e E7 de HPV 16 por <i>phage display</i> .....	42
3.8 Análise da especificidade de ligação dos peptídeos selecionados às proteínas.....	45
3.9 Peptídeos sintéticos.....	47
3.10 Análise do sítio de ligação dos peptídeos à E6.....	48
3.11 Análise funcional dos peptídeos em linhagens celulares.....	51
3.12 Varredura do banco de compostos “ <i>Pandemic Response Box</i> ”.....	54
3.13 Análise estatística.....	56
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
4.1 Primeiro passo: a produção de E6 e E7 recombinantes.....	58
4.2 Seleção de ligantes para as oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16.....	62
4.3 Análise da especificidade de ligação dos fagos à E6.....	65
4.4 Análise funcional de A2 e A10 como peptídeos sintéticos.....	69
4.5 Identificação do sítio de ligação dos fagos A2 e A10 na oncoproteína E6.....	70

4.6 Análise <i>in silico</i> dos peptídeos A2 e A10 e sua ligação à E6: modelagem computacional e simulação de dinâmica molecular.....	74
4.7 Análise funcional dos peptídeos A2 e A10 em linhagens celulares.....	85
4.8 Ligação fago-proteína como ferramenta: varredura do banco de compostos “ <i>Pandemic Response Box</i> ” .....	92
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>106</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>107</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>120</b>
<b>LISTA DE ANEXOS.....</b>	<b>126</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O impacto da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e das patologias associadas

A infecção por HPV é responsável por aproximadamente 700 mil novos casos de câncer anualmente, além de muitas infecções assintomáticas que podem progredir para lesões benignas, pré-malignas e malignas (DE MARTEL *et al.*, 2020; SERRANO *et al.*, 2018). Este vírus é o agente etiológico de virtualmente todos os cânceres de cérvix uterina, a quarta causa de morte por câncer entre as mulheres (SUNG *et al.*, 2021). Além da cérvix uterina, o HPV tem papel em outros cânceres anogenitais e de cabeça e pescoço (Tabela 1).

**Tabela 1 – Incidência mundial de casos de câncer totais e atribuíveis à infecção por HPV.**

Região anatômica	Novos casos	Atribuíveis à infecção por HPV	Atribuíveis à infecção por HPV (%)
Cérvix uterina	570.000	570.000	100%
Orofaringe	140.000	42.000	30%
Cavidade oral	280.000	5.900	2,1%
Laringe	180.000	4.100	2,3%
Ânus*	40.000	35.000	88%*
Pênis	34.000	18.000	53%
Vagina	18.000	14.000	78%
Vulva	44.000	11.000	25%

Fonte: DE MARTEL *et al.*, 2020; \*DE MARTEL *et al.*, 2017.

Os tipos virais que promovem a transformação maligna da célula são conhecidos como tipos de alto risco oncogênico (hr-HPV, *high-risk Human Papillomavirus*), enquanto outros HPV, denominados de baixo risco oncogênico, estão envolvidos na patogênese de neoplasias benignas, como verrugas genitais e a

papilomatose laríngea (SERRANO *et al.*, 2018). O HPV 16 é o tipo mais prevalente nas lesões malignas, seguido pelos tipos 18 e 31 (DE VUYST *et al.*, 2009; WEAVER, 2006). Aproximadamente 60% dos tumores de cérvix uterina são causados pelo HPV 16, destacando a importância deste tipo viral na carcinogênese (SANJOSE *et al.*, 2018).

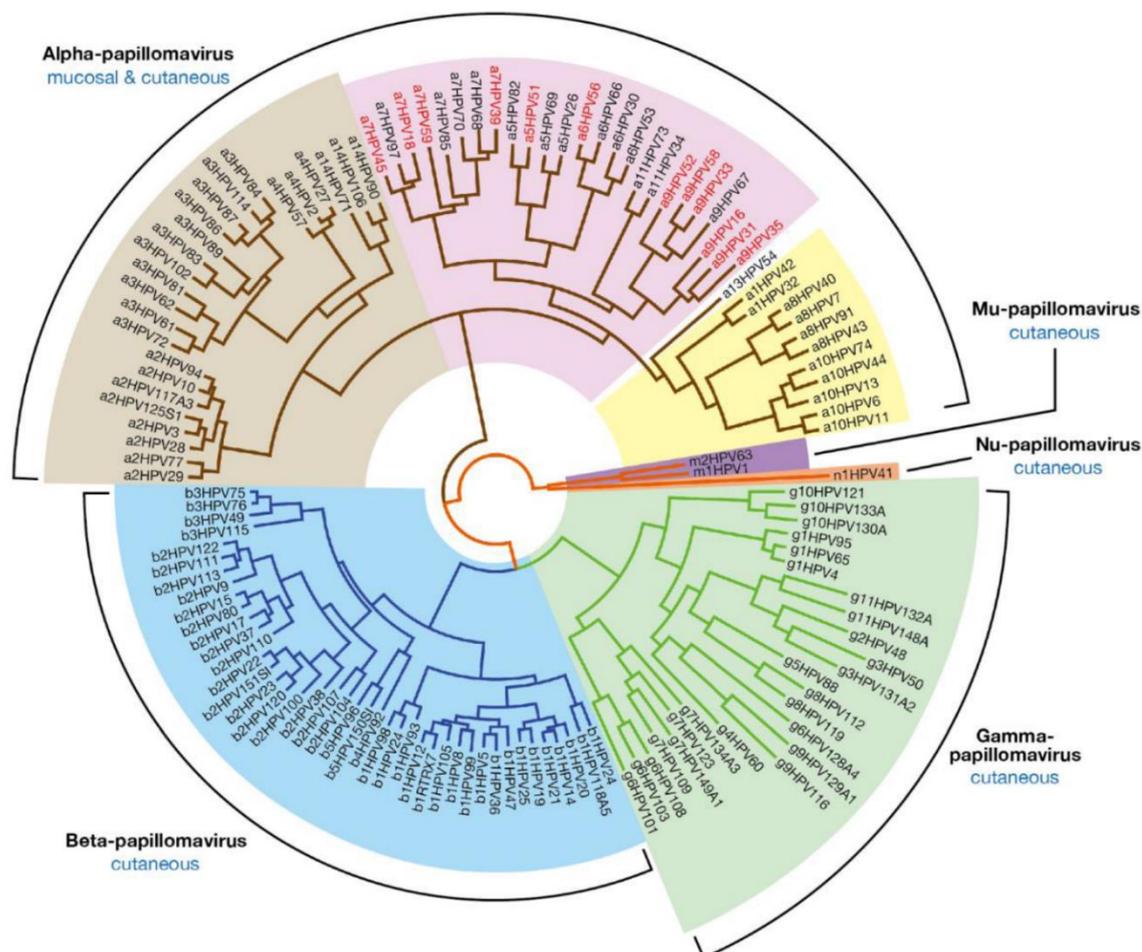
Os HPV são majoritariamente transmitidos via contato físico direto. Os tipos virais que infectam o trato anogenital são transmitidos por contato sexual e estima-se que probabilidade de adquirir HPV até os 45 anos de idade tendo pelo menos um parceiro do sexo oposto é de 85% para as mulheres e 92% para os homens (CHESSON *et al.*, 2014). Embora menos frequentes, as vias de transmissão digital-genital, oral-genital e perinatal também devem ser consideradas (BURCHELL *et al.*, 2006). A infecção por mais de um tipo viral é comum, sejam elas múltiplas infecções ou infecções sequenciais (KOPS *et al.*, 2021).

A imunidade natural contra HPV é variável, modesta e direcionada a um único tipo (STANLEY, 2012; WOO *et al.*, 2008). Felizmente, a maioria das infecções é resolvida pelo próprio organismo em até dois anos, e a falha na resolução da infecção é sabidamente o principal fator de risco para o desenvolvimento de tumores no colo uterino (CASTLE *et al.*, 2009; MOSCICKI *et al.*, 2014). Além da persistência, o tipo viral, a resposta imune do hospedeiro, e fatores comportamentais como tabagismo e uso prolongado de contraceptivos orais também são fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias (INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER *et al.*, 2006; 2007).

## 1.2 O papilomavírus humano (HPV)

O HPV é um vírus pequeno, não envelopado, com tropismo pelo epitélio queratinizado da pele e mucosas. São vírus altamente tecido- e espécie-específicos, cuja coevolução com o hospedeiro é uma característica marcante. Pertencem à família *Papillomaviridae*, com mais de 200 genótipos de HPV descritos, conhecidos como “tipos virais”. Eles são divididos em cinco gêneros: *alfa*, *beta*, *gama*, *mu* e *nu*, de acordo com a sequência da proteína principal do capsídeo, a L1 (Figura 1) (DE VILLIERS, 2013).

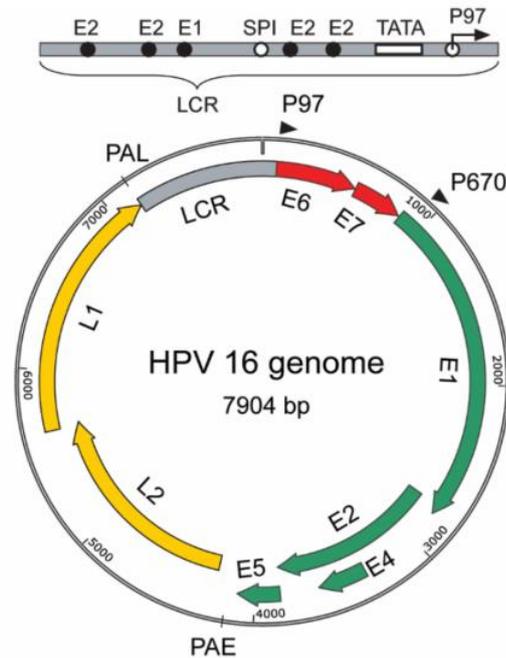
Figura 1 – Classificação dos genótipos de HPV.



Dentro do gênero *alfa*, os tipos virais podem ser subclassificados ainda em vírus de alto ou baixo risco oncogênico, de acordo com sua capacidade de promover a formação de neoplasias malignas (PIM; BANKS, 2010). Os tipos virais de alto risco oncogênico são HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 63, 73 e 82, enquanto os HPV 26, 53 e 66 são provavelmente oncogênicos. Os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70 e 81 foram classificados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) como vírus de baixo risco oncogênico, relacionados a lesões benignas e verrugas (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

O material genético do HPV é DNA dupla-fita e seu genoma apresenta aproximadamente 8.000 pares de bases (pb). A figura 2 representa a organização genômica do HPV 16, protótipo dos vírus de alto risco oncogênico. O genoma é dividido em três regiões principais: a “LCR” (*long control region*, região longa controladora), “E” (*early*, precoce) e “L” (*late*, tardia). A região “LCR” engloba a origem de replicação do genoma viral e possui sítios de ligação para diversos fatores de transcrição celulares e virais. Os genes “E” codificam seis proteínas e são conhecidos como “*early*” (precoces) por se expressarem no início da infecção: E1, E2, E4, E5, E6 e E7. As proteínas do capsídeo, L1 e L2, são expressas apenas nas camadas mais diferenciadas do epitélio, sendo denominadas como “*late*” (tardias). Durante a infecção produtiva, a expressão dos genes precoces e tardios é altamente controlada a nível transcricional e de processamento de RNA por sítios alternativos de poliadenilação e *splicing*, acompanhando os estágios de diferenciação da célula infectada (SCHWARTZ *et al.*, 2013).

**Figura 2 – O genoma do HPV16.**

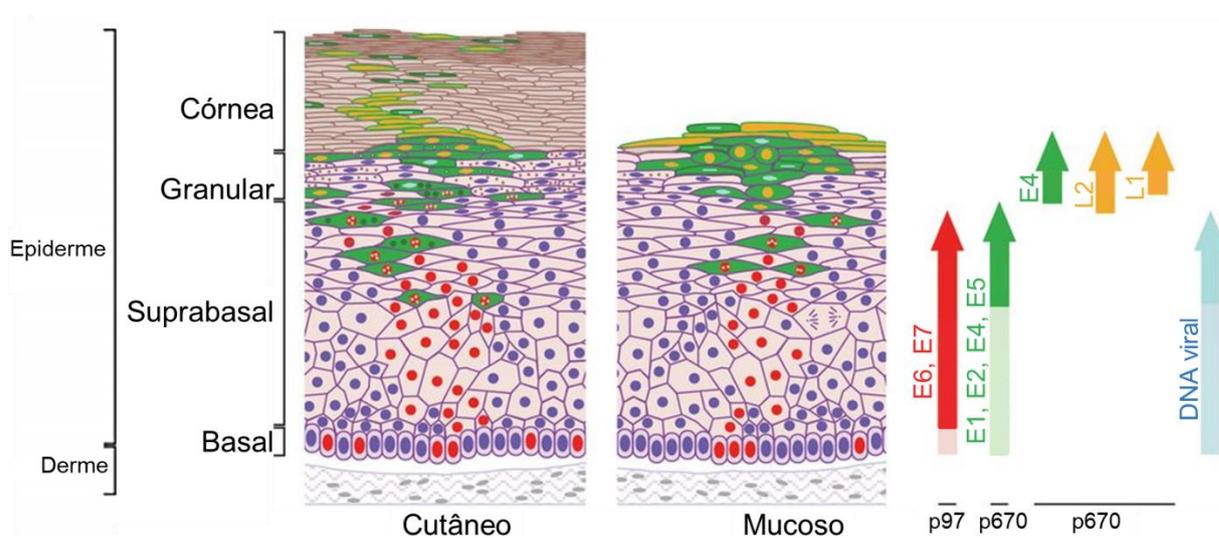


Representação esquemática do genoma do HPV 16, que pode ser dividido em região controladora (LCR), genes precoces (E1 a E7) e tardios (L1 e L2). Na parte superior da imagem, destaque para os sítios de ligação para fatores de transcrição celulares (SPI) e virais (E1, E2) presentes na LCR. PAE: sítio de poliadenilação precoce; PAL: sítio de poliadenilação tardio; p97: promotor precoce; p670: promotor tardio. Fonte: modificado de BASUKALA; BANKS, 2021.

A infecção pelo HPV requer microtraumas no epitélio, que permitem que o vírus acesse a camada basal de células e inicie seu ciclo de infecção. A adsorção do HPV às células ocorre via interação da proteína L1 com proteoglicanas de heparan sulfato. O reconhecimento promove mudança conformacional no capsídeo viral e permite a ligação a um complexo receptor, mediando a internalização por endocitose. Através do sistema de tráfego intracelular, o DNA viral é direcionado ao núcleo, onde permanece na forma epissomal (AKSOY; GOTTSCHALK; MENESES; 2017). Como já pontuado, as proteínas “E” são as primeiras a serem expressas durante a infecção, levando à proliferação celular, manutenção e amplificação do genoma viral, bem como evasão do sistema imune e da indução de apoptose (Figura 3) (DOORBAR, 2005). Visto que a expressão dos genes virais é modulada pela diferenciação dos queratinócitos infectados, a expressão das proteínas “L”, as proteínas estruturais do

capsídeo, se dá apenas nas camadas celulares mais superiores, nas quais as partículas virais são montadas e liberadas com a descamação do epitélio, permitindo a infecção de outro hospedeiro. (GRAHAM, 2017). Ademais, a produção de L1 e L2 apenas nas camadas mais diferenciadas contribui para a evasão do sistema imune, uma vez que estes queratinócitos constituem um local imunologicamente privilegiado.

**Figura 3 – A infecção pelo HPV.**



Desenho esquemático do epitélio cutâneo (esquerda) e mucoso (direita) infectado pelo HPV, representando os eventos do ciclo de vida viral e as proteínas virais expressas nas diferentes camadas do epitélio (basal, suprabasal ou espinhosa, granular e córnea). Modificado de: DOORBAR, 2006.

### 1.3 As proteínas precoces codificadas pelo HPV

Uma vez no núcleo da célula infectada, o DNA do HPV é amplificado, transcrito e traduzido nas proteínas virais. A proteína E1 é a única enzima codificada pelo genoma do HPV, uma helicase dependente de ATP responsável pelo reconhecimento e abertura da origem de replicação viral e pelo recrutamento da maquinaria celular de replicação do DNA (BERGVALL; MELENDY; ARCHAMBAULT, 2013). Já a proteína E2 é um fator capaz de se ligar às regiões controladoras no genoma viral, funcionando como regulador transcricional. Participa também da replicação do genoma viral, uma

vez que colabora com E1 para iniciar a replicação (MCBRIDE, 2013). A expressão da proteína E4 ocorre nas camadas intermediárias e finais do epitélio, onde a sua principal ação é o rompimento da arquitetura dos filamentos de citoqueratina para facilitar a liberação das partículas virais (WANG *et al.*, 2004).

A E5, por sua vez, é uma pequena proteína com três domínios transmembrana, encontrada na membrana de organelas como o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, o núcleo e os endossomos (DISBROW; HANOVER; SCHLEGEL, 2005; HU; CERESA, 2009). Sua ampla gama de efeitos reflete sua capacidade de se ligar a diversos alvos celulares, como o estímulo à proliferação pela ligação ao EGFR, a evasão do sistema imune pela modulação da localização celular do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e o escape à morte celular por apoptose pela ligação a proteínas sinalizadoras como FAS, BCL-2 e BAX, entre outros (ASHRAFI *et al.*, 2005; DIMAIO; PETTI, 2013).

Assim como E5, as proteínas E6 e E7 possuem muitos alvos celulares, sendo responsáveis pela manutenção da proliferação celular. Os genes de E6 e E7 são expressos sob regulação de um promotor precoce comum e seus produtos proteicos atuam de maneira cooperativa para orquestrar a divisão celular a favor da replicação viral (HELT; FUNK; GALLOWAY, 2002; MOODY; LAIMINS, 2010; YEO-TEH; ITO; JHA, 2018).

#### **1.4 E6 e E7: as oncoproteínas dos hr-HPV e seus alvos celulares**

A E6 é uma proteína de aproximadamente 20kDa constituída por dois motivos do tipo dedo-de-zinco e, no caso dos hr-HPV, também apresenta um motivo carboxi-terminal de ligação à domínios PDZ (PBM; *PDZ-binding motif*) (ZANIER *et al.*, 2012). O alvo celular clássico de E6 é a proteína p53, supressor tumoral responsável pelo

controle do ciclo celular (SCHEFFNER *et al.*, 1990). A p53 é ativada em resposta a sinais hiperproliferativos ou ao dano no DNA e impede a progressão do ciclo celular para permitir o reparo das lesões no DNA, além de estar envolvida na ativação de vias de apoptose. A E6 liga-se à uma ubiquitina ligase E6AP e então à p53, levando-a à degradação proteossômica. Assim, a célula infectada é capaz de continuar proliferando e de evitar a apoptose mesmo na presença de danos no DNA (SCHEFFNER *et al.*, 1993).

E6 ainda atua em outras proteínas da via apoptótica, como BAK, FADD e a procaspase 8, modulando a expressão e atividade destas proteínas para impedir a morte celular (FILIPPOVA *et al.*, 2007; FILIPPOVA; PARKHURST; DUERKSEN-HUGHES, 2004; THOMAS; BANKS, 1999). As vias de sinalização PI3K-AKT, WNT e NOTCH também são alvos da E6, cuja interferência leva ao atraso no comprometimento do queratinócito infectado com a diferenciação celular e à divisão celular descontrolada (CONTRETAS-PAREDES *et al.*, 2009; LICHTIG *et al.*, 2010; WEIJZEN *et al.*, 2003). E6 também reativa a expressão de hTERT, a subunidade catalítica da telomerase, evitando assim que a célula entre em senescência replicativa por erosão dos telômeros (LIU *et al.*, 2009; OH; KYO; LAIMINS, 2001).

O motivo PBM presente na região carboxi-terminal das E6 dos hr-HPV pode reconhecer e se ligar a diversas proteínas com domínio PDZ, como hDLG e hSCRIB, desestabilizando a polaridade celular e as junções intercelulares para contribuir com o processo de carcinogênese (GARDIOL *et al.*, 1999; THOMAS *et al.*, 2005, 2016). E6 também interage com IRF3, um fator regulador da expressão de interferon-beta, e com alvos relacionados ao estabelecimento do estado antiviral na célula e do reconhecimento por células do sistema imune inato, levando à evasão do sistema imune (POIRSON *et al.*, 2022; RONCO *et al.*, 1998). Diversas outras vias celulares

são desreguladas pela ligação das E6 dos hr-HPV a seus alvos, resultando em promoção da angiogênese por expressão de VEGF-A e desregulação metabólica, que favorece a captação de glicose (GANTI *et al.*, 2016; LÓPEZ-OCEJO; 2000). Somada à alta captação de glicose promovida pela E6, a oncoproteína E7 também desvia o metabolismo celular para a glicólise aeróbia, promovendo o “efeito Warburg”, característico de células tumorais (ZWERSCHKE *et al.*, 1999).

A E7, por sua vez, é uma fosfoproteína de aproximadamente 11kDa, formada por um motivo “dedo de zinco” carboxi-terminal e uma porção amino-terminal intrinsecamente desordenada, que confere plasticidade de ligação a seus alvos celulares (CALÇADA *et al.*, 2013; GARCÍA-ALAI; ALONSO; DE PRAT-GAY, 2007; PHELPS *et al.*, 1992). Ademais, o reconhecimento de seus ligantes depende também da fosforilação diferencial que esta sofre em seus domínios, variável durante a progressão do ciclo celular (MASSIMI; BANKS, 2000).

As proteínas pRB, p107 e p130 são alvos importantes das E7 de hr-HPV, já que são uma família de proteínas supressoras tumorais, responsáveis por controlar a entrada no ciclo celular (HU *et al.*, 1995). A desregulação proliferativa promovida por E7 se dá pela liberação dos fatores de transcrição da família E2F regulados por pRB, além de interagir com CUL2, uma ubiquitina-ligase que promove a degradação proteossômica de pRB (HUH *et al.*, 2007). A proteína E7 também é capaz de interagir com complexos ciclina-CDK e com inibidores de CDK (CKI), como p21 e p27, favorecendo a divisão celular (FUNK *et al.*, 1997; ZERFASS *et al.*, 1995; ZERFASS-THOME *et al.*, 1996). Tais interações resultariam na ativação de p53, que por sua vez é inibida pela expressão de E6, evidenciando a ação cooperativa destas oncoproteínas em sequestrar a maquinaria de replicação viral e promover a proliferação celular.

A instabilidade genômica instaurada pela expressão das oncoproteínas E6 e E7 é um importante mecanismo que leva ao acúmulo de diversas mutações nos cânceres induzidos por HPV, sendo as mais frequentes nos genes de PI3KCA, PTEN, HLA-A e B, nos genes dos componentes das vias de NOTCH1 e de RAS/EGFR/ERK. Por outro lado, p53 e pRB raramente apresentam mutações nestes tumores, em contraposição aos tumores HPV-negativos (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.*, 2017). A E7 também leva a defeitos no alinhamento dos cromossomos, que resulta em aneuploidias e erros de segregação mitótica (NGUYEN *et al.*, 2007). Os mecanismos de reparo do DNA são igualmente danificados, com prejuízo da sinalização de ATM/ATR, bem como da recombinação homóloga por ligação à RAD51 (KADAJA *et al.*, 2009; WALLACE *et al.*, 2017).

A E7 desencadeia a reprogramação epigenética da célula infectada, ao interagir com DNA-metiltransferases (DNMT), Histona-deacetilases (HDAC), Histona-acetiltransferases (HAC) e Histona-demetilases (HDM), enzimas chave na regulação das marcas epigenéticas que controlam a expressão gênica (AVVAKUMOV; MYMRYK, 2003; BODILY; MEHTA; LAIMINS, 2011; BURGERS *et al.*, 2007; MCLAUGHLIN-DRUBIN *et al.*, 2011).

Por fim, E6 e E7 contribuem com a transição epitélio-mesenquimal nos queratinócitos, favorecendo o fenótipo maligno e a invasão (D’COSTA *et al.*, 2012; HELLNER *et al.*, 2009). Assim, por meio das diversas interações com proteínas celulares, as oncoproteínas E6 e E7 partem de um evento pró-proliferativo que visa facilitar a amplificação viral do HPV e acidentalmente terminam por orquestrar a carcinogênese no epitélio infectado.

## **1.5 A persistência da infecção pelo HPV, a expressão das oncoproteínas e o desenvolvimento de neoplasias**

A persistência viral e o desenvolvimento de neoplasias no colo uterino estão intimamente relacionados à integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, evento esporádico que interrompe a infecção produtiva e a liberação de partículas virais (MÜNGER, 2016; OYERVIDES-MUÑOZ *et al.*, 2018). Durante a integração, o gene E2 é rompido e perde sua atividade de regulador transcricional, levando ao aumento dos níveis de E6 e E7 na célula, antes sobre rígido controle de expressão por E2 (MÜNGER *et al.*, 2004). A expressão constitutiva das oncoproteínas facilita as interações proteicas descritas na sessão anterior, levando à instabilidade genômica, imortalização e transformação maligna das células infectadas.

Nos carcinomas de colo uterino, o genoma do HPV-16 se integra em 75% dos casos, enquanto o genoma de HPV 18 encontra-se integrado ao DNA celular com frequência ainda maior (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.*, 2017). Nos tumores de cabeça e pescoço induzidos por HPV a integração é pouco frequente, apontando para um mecanismo ligeiramente diferente de carcinogênese, que envolve a expressão de E2, E4 e E5, além de E6 e E7 (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015; REN *et al.*, 2020).

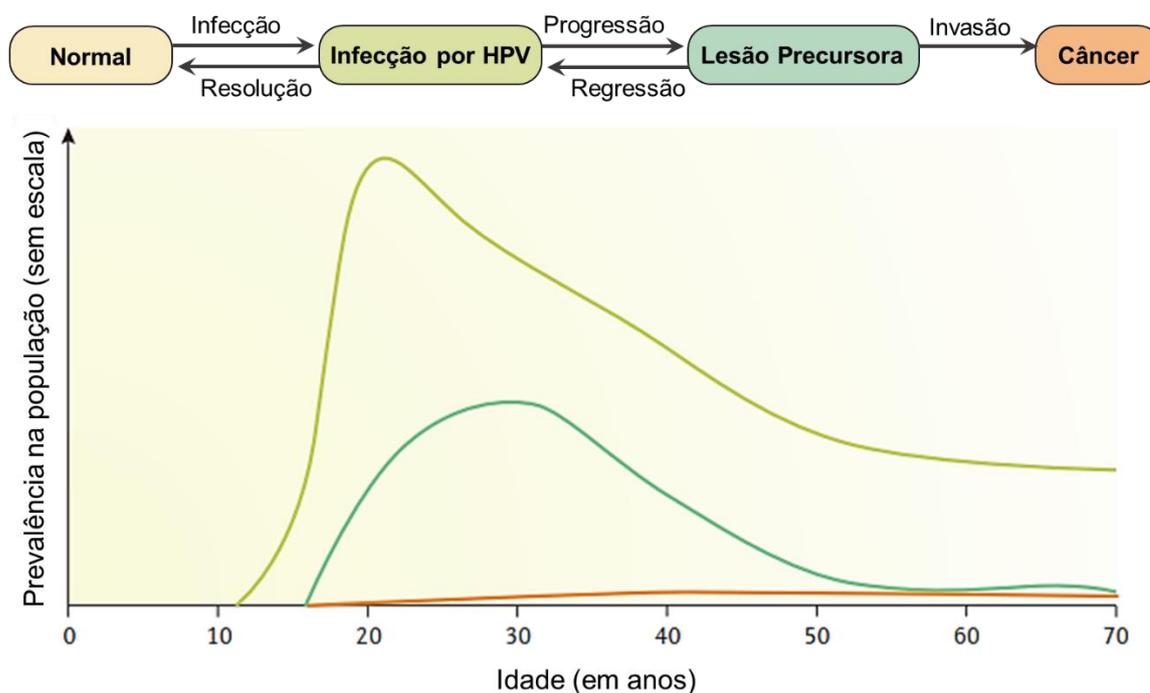
A figura 4 resume a história natural do HPV no colo uterino. Enquanto menos de 20% das infecções persistem após um ano e continuam a serem resolvidas nos primeiros cinco anos após a infecção, menos de 5% das infecções persistentes progridem para lesões de alto grau, e menos de 1% destas, para carcinoma invasivo (FRANCO *et al.*, 1999; MITCHELL *et al.*, 1994; SKINNER *et al.*, 2016).

A vacina profilática contra HPV, disponível desde 2006, foi um marco na prevenção da infecção e uma esperança na redução da incidência das lesões precursoras e dos cânceres no colo do útero, visto a alta eficácia das vacinas quando

administradas em indivíduos que nunca tiveram contato com o vírus (DROLET *et al.*, 2019). Trata-se de uma vacina recombinante, construída a partir da proteína L1 de cada tipo viral que se organiza em VLPs (*Virus-like particles*, partículas semelhantes a vírus) (VILLA *et al.*, 2005). Atualmente, três formulações estão aprovadas e disponíveis para uso clínico: a Cervarix®, da GSK, contra os tipos de HPV 16 e 18; a Gardasil®, contra os tipos 16, 18, 6 e 11, e a Gardasil-9®, que protege contra nove tipos virais, a saber: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, e 58, ambas comercializadas pela Merck, Sharp & Dohme. Desta maneira, as vacinas quadri e nonavalentes, além de evitar o desenvolvimento de tumores malignos associados a tipos virais específicos, também protegem contra a formação de verrugas genitais e laríngeas ao imunizar contra os tipos 6 e 11.

Apesar da alta eficácia na profilaxia da infecção por HPV, a cobertura vacinal mundial ainda está longe do ideal e muito discrepante entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, com cobertura média global de aproximadamente 20% (BRUNI *et al.*, 2021). Segundo o Ministério da Saúde, a cobertura total no Brasil em 2020 foi de 55%. É importante considerar que as vacinas profiláticas contra HPV não são eficazes como terapia em indivíduos infectados (VILLA, 2011). O tempo relativamente longo entre a infecção e o desenvolvimento de tumores malignos, que pode levar até 30 anos, fornece uma janela de oportunidade para tratar a infecção por HPV antes do desenvolvimento de neoplasias (Figura 4). Porém, até o momento, não há abordagens terapêuticas específicas contra HPV aprovadas para uso clínico.

**Figura 4 – Modelo conceitual da progressão da infecção por HPV no colo do útero.**



Representação do curso da infecção por HPV e sua progressão para lesões precursoras e câncer invasivo, com destaque para a evolução rara e lenta para neoplasia maligna e para as etapas onde pode haver regressão do quadro clínico. Fonte: modificado de SCHIFFMAN *et al.*, 2016.

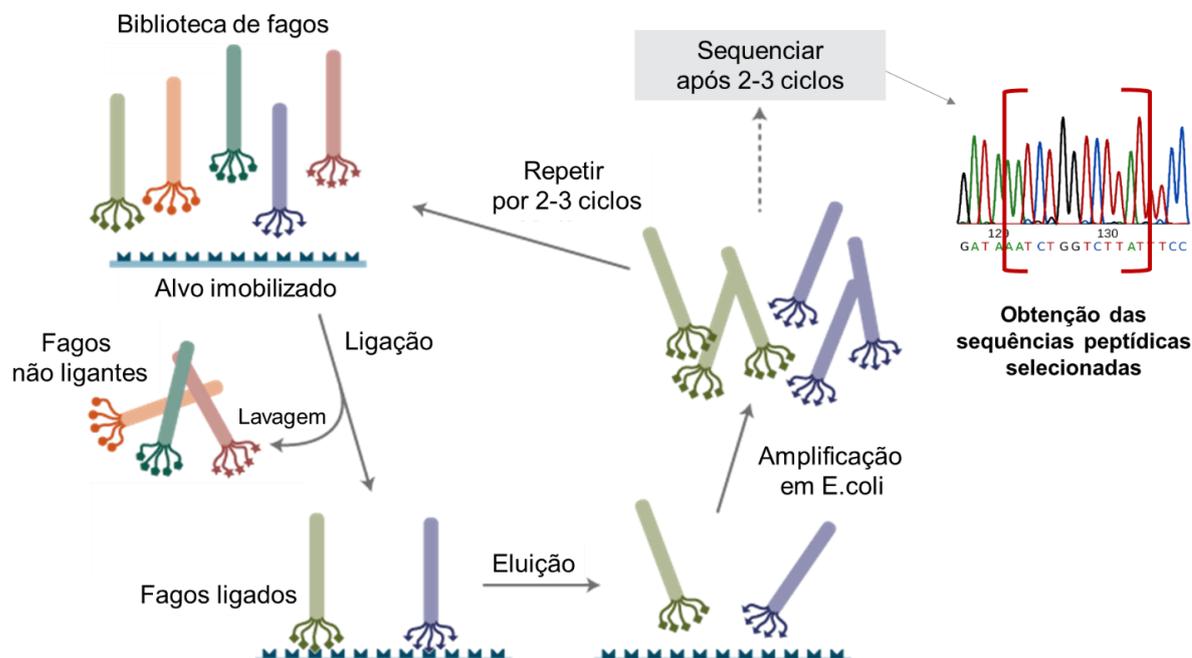
Neste cenário, E6 e E7 são alvos ideais para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas, uma vez que o silenciamento de qualquer uma delas leva a célula infectada à senescência e apoptose (BUTZ *et al.*, 2003; JUBAIR; FALLAHA; MCMILLAN, 2019). Além disso, E6 e E7 não possuem similaridade com nenhuma proteína celular, reduzindo a probabilidade de efeitos colaterais (MITTAL; BANKS, 2017). A E6 também apresenta características físico-químicas e bolsos de ligação capazes de acomodar pequenas moléculas (ZANIER *et al.*, 2014). Mesmo assim, as diversas tentativas de desenvolvimento de inibidores de E6 e E7 – peptídeos, anticorpos, compostos químicos – não resultaram em alternativas clinicamente viáveis até o momento (ACCARDI *et al.*, 2005; CHITSIKE *et al.*, 2021; DYMALLA *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2011; KARLSSON *et al.*, 2015; LAGRANGE *et al.*, 2007; VERACHI *et al.*, 2018).

## 1.6 Busca de novos ligantes utilizando a tecnologia de *phage display*

A tecnologia de *Phage display* é uma estratégia valiosa para a busca de ligantes peptídeos para qualquer alvo biológico, com as mais variadas aplicações em estudos funcionais, diagnóstico e terapia (TANG *et al.*, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2021). Foi proposta por George P. Smith em 1985 e aprimorada para englobar a apresentação de diferentes bibliotecas peptídicas e anticorpos (GIORDANO *et al.*, 2001; SMITH, 1985; WINTER *et al.*, 1994). Trata-se de uma técnica de clonagem cujo objetivo é expor pequenas sequências aleatórias de peptídeos (5 a 15 aminoácidos) no capsídeo de fagos filamentosos e utilizá-los como plataforma para encontrar motivos peptídicos que se liguem com alta especificidade a um alvo de interesse (Figura 5) (MICHALOSKI *et al.*, 2016; SMITH; PETRENKO, 1997).

O estudo de pequenos peptídeos derivados de análises combinatoriais para o desenvolvimento de fármacos tem sido explorado por suas vantagens frente a outras terapias, como menor custo para síntese química quando comparado a proteínas e anticorpos, alta especificidade e baixa toxicidade a órgãos e tecidos, tornando-os moléculas promissoras para o uso terapêutico (KASPAR; REICHERT, 2013; PASQUALINI *et al.*, 2015; VLIEGHE *et al.*, 2010). Por outro lado, muitas vezes ligantes peptídicos não apresentam propriedades farmacológicas favoráveis para aplicação clínica direta, mas podem servir como guia para a busca de pequenas moléculas capazes de mimetizar suas ligações, otimizadas para uso terapêutico.

**Figura 5 – A tecnologia de *Phage display*.**



A seleção de ligantes por *phage display* é realizada pela imobilização do alvo em placas, incubação com a biblioteca de fagos, seguida de lavagem e recuperação dos fagos ligados. Após amplificação e precipitação, os fagos selecionados são novamente incubados com o alvo imobilizado, buscando amplificar as sequências ligantes. Ao final de dois a quatro ciclos de seleção, o DNA dos fagos é sequenciado para inferência das sequências peptídicas expostas pelos fagos selecionados. Fonte: modificado de <https://international.neb.com/products/e8110-phd-12-phage-display-peptide-library-kit#Product%20Information>.

Assim, neste projeto, foram utilizadas bibliotecas de *phage display* construídas em nosso laboratório para a busca de novos ligantes peptídicos para as proteínas E6 e E7 que pudessem inibir a função destas proteínas durante a infecção por HPV. Visto que os tratamentos disponíveis para os tumores induzidos por HPV são invasivos e inespecíficos para a biologia do vírus, o desenvolvimento de inibidores de E6 e E7 permitiria o manejo da infecção por HPV antes do estabelecimento da carcinogênese, com alta especificidade e baixa toxicidade, uma vez que agiria preferencialmente em células infectadas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Identificar e caracterizar novas moléculas inibidoras das oncoproteínas E6 e E7 do vírus de alto risco oncogênico HPV 16 para o desenvolvimento de novas terapias para doenças causadas pelo papilomavírus humano.

- 

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar, pela tecnologia de *Phage Display*, peptídeos que se liguem às oncoproteínas E6 e E7 de HPV16;
- Verificar se os peptídeos selecionados por *Phage Display* se ligam com especificidade às oncoproteínas E6 e E7 de HPV16;
- Identificar, dentre os peptídeos mais promissores, o sítio de ligação nas oncoproteínas E6 e E7 e seu potencial para inibir a interação destas com seus alvos celulares;
- Avaliar se os peptídeos selecionados apresentam efeitos antitumorais em linhagens celulares derivadas de tumores HPV-positivos;
- Utilizar a interação fago-proteína para desenvolver um ensaio de busca de ligantes para a proteína E6 de HPV.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Clonagem dos genes E6 e E7 para expressão em sistema bacteriano

Os genes E6 e E7 do HPV 16 foram subclonados no vetor de expressão em procariotos pAE (RAMOS et al., 2004) a partir do vetor pBR322 contendo o genoma completo do HPV16, cedido pela Dra. Laura Sichero. Para isso, as sequências genômicas de E6 e E7 foram individualmente amplificadas utilizando-se oligonucleotídeos específicos (Tabela 2) para promover adição dos sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *HindIII* à montante e à jusante dos genes de interesse, respectivamente. A reação de PCR foi realizada com o mix de enzima de alta fidelidade *KAPA HiFi HotStart ReadyMix* (Hoffmann-La Roche, Basileia, Suíça) contendo 0,5 nM de cada oligonucleotídeo e 2 ng de DNA sob as condições de ciclagem: 95 °C por 3 min, 30 ciclos de 98 °C por 20 s, 65 °C por 15 s e 72 °C por 30 s, seguidos de uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Após a amplificação, os fragmentos foram purificados com o kit *PCR purification kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante e digeridos com as enzimas *XhoI* e *HindIII* (Fermentas®, ThermoFisherScientific, MA, EUA). O vetor pAE, por sua vez, foi transformado por eletroporação (2,5 kV) na cepa bacteriana DH10B (GRANT, BLOOM, HANAHAN, 1990) e plaqueado em LB ágar (Invitrogen®, ThermoFisherScientific, MA, EUA) contendo 50 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich, MO, USA) para seleção, e incubado por 16h em estufa a 37 °C. Uma colônia foi recuperada e adicionada a 5 mL de meio LB (Sigma-Aldrich, MO, USA) contendo 50 µg/mL de ampicilina, incubado em shaker a 37 °C, 250 rpm, por 16 h. Após este período, a cultura bacteriana saturada foi centrifugada a 6.800 xg por 3 min e o pellet

foi utilizado para preparação plasmidial em pequena escala pelo kit *QIAGEN Plasmid Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. A purificação do vetor foi verificada por eletroforese e o vetor foi digerido com as mesmas enzimas que os insertos, a saber *XhoI* e *HindIII*, e desfosforilado com fosfatase alcalina (Hoffmann-La Roche, Basileia, Suíça), seguindo as recomendações do fabricante. Vetor e insertos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% e sua quantidade foi estimada por comparação ao marcador de peso molecular *Gene Ruler 1kb plus* (ThermoFisher Scientific, MA, EUA). A reação de ligação se deu pela enzima *T4 DNA ligase* (ThermoFisher Scientific, MA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, testada nas proporções molares inserto:vetor 1:1, 3:1 e 5:1. As reações de ligação foram imediatamente transformadas por eletroporação na cepa de eletrocompetente de *E. coli* DH10B, recuperadas em 1 mL meio SOC (2 % triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glicose) e cultivadas por 30 min a 37 °C. Após este período, cada uma das condições foi individualmente plaqueada em LB-ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C por 16 h. Como controle negativo, o vetor pAE digerido e desfosforilado foi submetido às mesmas etapas de ligação e transformação, na ausência de insertos. Para confirmar o sucesso da clonagem, as colônias foram individualmente recuperadas por diluição em LB 10% glicerol em placas com fundo em "U" e submetidas a reações de PCR com 0,2 mM dos primers T7-Fw e T7-Rv (Tabela 2), 0,2 mM de dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µl enzima *Taq Platinum* (ThermoFisher Scientific, MA, EUA) e seu respectivo tampão. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e cinco clones com tamanho esperado para cada gene (655 pb para pAE:E6 e 475 pb para pAE:E7) foram sequenciados pelo método de Sanger com o reagente *BigDye Terminator v3.1*

*Cycle Sequencing Kit* (ThermoFisher Scientific, MA, EUA) em plataforma *ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer* (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) utilizando os mesmos primers T7, a fim de excluir possíveis mutações ou alterações no passo de leitura dos genes de interesse.

### **3.2 Expressão heteróloga das oncoproteínas virais E6 e E7**

Para expressão heteróloga de E6 e E7, o DNA plasmidial das construções pAE:E6 e pAE:E7 foi amplificado e purificado via preparação plasmidial como já descrito. Após quantificação por método espectrofotométrico (Nanodrop 2000™, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 100 ng de cada vetor foi individualmente transformado por eletroporação na cepa de expressão *E. coli Rosetta™ pLysS*, recuperados em 1 mL meio SOC e plaqueados em LB-ágar contendo 50 µg/ml de ampicilina para cultivo a 37 °C por 16 h. As colônias foram transferidas para meio LB líquido contendo 50 µg/ml de ampicilina e cultivadas a 37 °C, 200 rpm, por 16 h. A partir do pré-inóculo, as bactérias foram cultivadas em maior volume para induzir a expressão heteróloga dos genes de interesse por adição de 0,4 a 1 mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) na densidade óptica (D.O.) de 0,6. Alíquotas de 1 mL foram coletadas no início da indução e o volume das seguintes alíquotas foi normalizado de acordo com a D.O., para posterior análise em gel de poli-acrilamida a fim de estabelecer o tempo ideal para expressão, bem como verificar a solubilidade das proteínas expressas. Para o teste de solubilidade, as células foram lisadas por choque térmico com 5 ciclos de gelo-seco – banho-maria a 37 °C seguidos de centrifugação a 13.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi considerado como a fração solúvel, enquanto o *pellet* recuperado foi solubilizado em 8 M Ureia para recuperação da fração proteica insolúvel. A expressão e a solubilidade das proteínas

foram analisadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15%. A expressão de E6 no vetor pAE também foi testada na cepa de *E. coli ArcticExpress* (Agilent Technologies, CA, USA), induzida com 1 mM de IPTG na D.O. de 0,5 e se deu a 13 °C por 24 h, conforme recomendado para esta cepa. A coleta das alíquotas para análise de expressão e solubilidade se deu como descrito anteriormente. O plasmídeo pGEX-2T contendo a construção para expressar a proteína E6 fusionada à GST (GST-E6), cedido pelo Dr. Lawrence Banks, foi sequenciado pelo método de Sanger como descrito anteriormente com primers específicos (Tabela 2) para confirmar a sequência e o quadro de leitura do gene de fusão GST-E6. Após eletroporação seguida de amplificação e purificação na cepa DH10B, foi introduzido na cepa *E. coli Rosetta™ pLysS* também por eletroporação e sua expressão foi otimizada nas seguintes condições: adição de 0,4 mM de IPTG na D.O de 0,5 e incubação a 25 °C, 200 rpm, por 6 h. A proteína GST também foi produzida em *E. coli Rosetta™ pLysS* a partir do vetor pGEX-6P-1 (Sigma-Aldrich, MO, EUA), com indução por 0,4 mM de IPTG a 37 °C, 200 rpm, por 3 h, pela mesma metodologia descrita.

### **3.3 Purificação das proteínas E6, E7, GST e GST-E6, por cromatografia de afinidade**

A proteína E6, expressa a partir do vetor pAE:E6, foi purificada em sua forma insolúvel utilizando-se um protocolo para purificação de corpos de inclusão. Brevemente, após 4 h de expressão, a cultura de bactérias foi centrifugada a 5.000 x g por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado em tampão de lise (20 mM Tris-base pH 8,0, 500 mM KCl, 5 mM β-mercaptoetanol) e submetido à lise por sonicação (*Output control* = 45; *Duty cycle* = 35; tempo = 4 min). Após a lise, foram adicionados um coquetel de inibidores de protease comercial (#P2714; Sigma-

Aldrich, MO, EUA) e 1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), incubados por 5 min antes de proceder à centrifugação a 7.000 x g por 30 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, lavado em tampão de lavagem I (100 mM Tris-base pH 8,0, 5 mM EDTA, 1 M Ureia, 5% Triton X-100) por duas vezes e em tampão de lavagem II (100 mM Tris-base pH 8,0, 1 M Ureia) por duas vezes, sempre centrifugado a 7.000 x g por 30 min entre as lavagens para separação entre *pellet* e sobrenadante, este último sempre descartado. Após a última lavagem, o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de tampão de solubilização (20 mM Tris-base pH 8,0, 100 mM KCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 8 M Ureia). Alíquotas de 20  $\mu$ L foram recuperadas em cada etapa para análise por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15%. Após a purificação, a proteína E6 foi submetida a dois protocolos de enovelamento: por diálise seriada para remoção gradual de ureia e por diluição infinita. O enovelamento por diálise seriada se deu pela diluição da proteína para 0,2 mg/mL seguida de diálise em membrana de 3.500 MWCO (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) em 2 L de Tampão Intracelular (TPI: 5mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM NaCl, 110mM KCl, pH 7,2) contendo 4 M de ureia à TA. Após duas e quatro horas do início da diálise, foram realizadas substituições de metade do tampão pelo mesmo tampão sem ureia, a fim de reduzir pela metade a quantidade de Ureia presente. A seguinte etapa de substituição para 0,5 M de ureia foi realizada na câmara fria a 6 °C por 12 h. O enovelamento proteico por diluição infinita se deu pela diluição lenta de 100  $\mu$ l de proteína a 1 mg/mL em 100 mL de TPI à TA. Para isso, 5  $\mu$ l por vez do corpo de inclusão contendo a proteína E6 eram adicionados ao volume total de tampão sob agitação magnética. Ao final, a solução contendo proteína e tampão diluídos foram incubados a 4 °C por 16 h. Então, foram centrifugadas a 5.000 xg por 10 min, com separação do sobrenadante e do *pellet* formado, que foram analisados por SDS-

PAGE em gel de acrilamida 15%. A proteína E7, expressa em fusão à cauda de polihistidina proveniente do vetor pAE, foi purificada na forma solúvel por cromatografia de afinidade por  $\text{Ni}^{2+}$  (*Ni-NTA Agarose*, Qiagen, Hilden, Alemanha). Já as proteínas GST e GST-E6 foram purificadas por cromatografia de afinidade por glutathione (*Glutathione HiCap Matrix*, Qiagen, Hilden, Alemanha). Em todos os casos, partiu-se de 100 mL de cultura saturada e foram seguidas as recomendações dos fabricantes das resinas. As proteínas foram eluídas em frações de 0,5 mL e analisadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15%. As frações contendo proteína foram dialisadas contra TPI, mantendo-se sempre a concentração final do agente redutor 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, e analisadas novamente por SDS-PAGE. Após quantificação pelo método de Bradford utilizando-se o reagente *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-rad Laboratories, CA, EUA), as proteínas foram armazenadas a - 80 °C até sua utilização nos ensaios.

### **3.4 Otimização do protocolo de expressão e purificação da proteína GST-E6**

Para otimização da produção de GST-E6, adicionado 0,1 mM de  $\text{ZnSO}_4$  ao meio de cultura no momento da indução da expressão por IPTG. Alíquotas foram coletadas para verificar a expressão e a solubilidade da proteína recombinante. Para a análise da solubilidade, alíquotas foram processadas como já descrito. A expressão e a solubilidade das proteínas foram analisadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. Confirmada a expressão, as bactérias foram rompidas por sonicação, centrifugadas, e o sobrenadante foi submetido à purificação em coluna de glutathione (*Glutathione HiCap Matrix*, Qiagen, Hilden, Alemanha). Além de ser adicionado imediatamente após a lise, adicionou-se inibidor de protease (#8465, Sigma-Aldrich,

MO, USA) também ao tampão de eluição da coluna (50 mM de Tris-Cl, 400 mM NaCl, 50 mM de glutathiona reduzida, 0,1% Triton X-100, 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol). Após a purificação, a proteína foi dialisada contra TPI, mantendo-se sempre 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol. Após a diálise, foi adicionado 1 mM de EDTA, 10% de glicerol e inibidor de protease. As frações resultantes foram analisadas por SDS-Page em gel de poliacrilamida 12%, quantificadas pelo método de Bradford, congeladas em gelo-seco e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento dos ensaios.

### **3.5 Ensaio de detecção das proteínas E6 e E7 com anticorpos específicos por F-LISA (*Fluorescence-linked immunosorbent assay*)**

As proteínas GST-E6 e E7 recombinantes foram imobilizadas (1  $\mu\text{g}$  / poço) individualmente em placa *high-binding* a  $4^{\circ}\text{C}$  por 16 h e bloqueadas com 200  $\mu\text{l}$  de *Odyssey Blocking Buffer PBS* (LI-COR Biosciences, NE, USA) por 2 h à TA. Os anticorpos anti-E6 e anti-E7 de HPV 16 (anti-16E6 e anti-16E7) produzidos em camundongo foram cedidos pela Arbor Vita (Arbor Vita Corporation, CA, USA) e utilizados nas diluições 1:400 e 1:200. Como controle, foi utilizada IgG de camundongo (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , #I5381, Sigma-Aldrich, MO, USA). Os anticorpos foram diluídos em PBS 10% *Odyssey Blocking Buffer* e incubados em volume final de 50  $\mu\text{l}$  por poço em duplicatas por 1 h à  $37^{\circ}\text{C}$ . Para a detecção, foi utilizado o anticorpo secundário marcado *IRDye® 680LT Donkey anti-Mouse IgG Secondary* (LI-COR biosciences, NE, USA) diluído 1:500 em PBS 10% *Odyssey Blocking Buffer*, incubado por 1 h à  $37^{\circ}\text{C}$  protegido da luz. Para controle positivo do anticorpo secundário, 1  $\mu\text{g}$  / poço de IgG de camundongo foi imobilizada e bloqueada como descrito para GST-E6. A detecção foi realizada no leitor infravermelho *Odyssey Image System*, utilizando-se o software do produto (LI-COR biosciences, NE, USA).

### **3.6 Biotinilação de E7 e GST e detecção por F-LISA**

As proteínas E7 e GST foram biotiniladas com o reagente *EZ-Link™ NHS-LC-Biotin* (*ThermoFisher Scientific*, MA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, foram dialisadas contra TPI, quantificadas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. A confirmação da biotinilação foi realizada por F-LISA nas proteínas imobilizadas (0,5 µg/poço) individualmente em placa *high-binding* a 4 °C por 16 h e bloqueadas com 200 µl de *Odyssey Blocking Buffer PBS* (*LI-COR Biosciences*, NE, USA) por 2 h à TA. Após lavagem com PBS, a detecção foi realizada pela adição da estreptoavidina marcada *IRDye® 680LT Streptavidin* (*LI-COR Biosciences*, NE, USA) diluída 1:500 em PBS 10% *Odyssey Blocking Buffer*, incubada por 1 h à 37 °C protegido da luz. A leitura se deu em *Odyssey Image System*, utilizando-se o software do produto (*LI-COR Biosciences*, NE, USA). Como controle positivo, utilizou-se o anticorpo biotinilado Anti-Fd (#B2661, *Sigma-Aldrich*, MO, USA) e para os controles negativos, as próprias proteínas não marcadas.

### **3.7 Seleção de peptídeos ligantes de GST-E6 e E7 de HPV 16 por Phage display**

*3.7.1 Panning contra proteínas imobilizadas em placa com recuperação dos fagos por eluição ácida*

As proteínas GST-E6 e GST (1 µg / poço) foram individualmente imobilizadas em triplicatas em placas *high-binding* de 96 poços (#3590, *Corning®*, NY, USA) por 16 h a 4 °C. Procedeu-se o bloqueio com TPI 3% BSA (Albumina Sérica Bovina, *Sigma-Aldrich*, MO, USA) por 2 h à TA e incubação com  $2 \times 10^9$  unidades transdutoras (TU, do inglês *transducing units*) de fagos das bibliotecas de peptídeos aleatórios construídas no Laboratório de Bioquímica Combinatorial do Instituto de Química –

IQ/USP (BEPPLER et al., 2016; MICHALOSKI et al., 2016). A biblioteca X6 (X = aminoácidos aleatórios) possui 6 aminoácidos aleatórios na forma linear, enquanto a biblioteca CX8C (C = cisteínas, X = aminoácidos aleatórios) apresenta 8 aminoácidos aleatórios e é circularizada por pontes dissulfeto entre as duas cisteínas das extremidades. As bibliotecas foram primeiramente incubadas com GST, a fim de sequestrar os fagos ligantes desta proteína. Após 2 h, o sobrenadante contendo os fagos que não se ligaram à GST foi retirado dos poços e adicionado aos poços contendo GST-E6, onde foram incubados por 2 h à TA. Após a lavagem com TPI para remoção de outros ligantes inespecíficos, a eluição dos fagos ligados se deu pela adição de 50 µl de tampão glicina 0,2 M, pH 2,2, por 5 min seguido de neutralização da solução por 8 µl de Tris 1 M, pH 9,1. Então, a solução neutralizada foi incubada com *E. coli K91kan* em DO ≈ 2,0 para recuperação dos fagos, que foram cultivados meio LB líquido contendo 50 µg/ml de canamicina e 20 µg/ml de tetraciclina – resistência conferida pela infecção com os fagos – a 37 °C, 200 rpm, por 18 h. Os fagos foram purificados do sobrenadante da cultura pelo método PEG/NaCl (GIORDANO et al., 2001) e ressuspensos em PBS. As triplicatas foram combinadas e clarificadas novamente contra GST antes da exposição à GST-E6 imobilizada em triplicata. Da mesma maneira, mais dois ciclos de seleção foram realizados. Após o último ciclo, os fagos eluídos com tampão glicina e recuperados por infecção bacteriana foram diluídos e plaqueados em LB-ágar contendo 50 µg/ml de canamicina e 40 µg/ml de tetraciclina para inferência do número de TU de fagos recuperados e do enriquecimento entre os ciclos. A partir das colônias formadas, os fagos foram armazenados em LB 10% glicerol e utilizados para reação de PCR de colônia seguido de análise por eletroforese em gel de agarose e sequenciamento. A reação de PCR de colônia com os oligonucleotídeos PhagePCR-F2 e PhagePCR-R1 (Tabela 2). A

PCR foi realizada com a enzima *Taq DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific, MA, EUA), Buffer 10X, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 nM de dNTPs, 0,5 nM de cada oligonucleotídeo, 20% de DMSO e 1 µl de DNA recuperado das colônias e diluído 1:100 em PBS. A ciclagem realizada consistiu em 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 10 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, e uma extensão final de 72 °C por 3 min. Os fragmentos amplificados, de aproximadamente 450 pb, foram visualizados em gel de agarose 1,5%. O produto da reação de PCR foi utilizado para sequenciamento pelo método de Sanger com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (ThermoFisher Scientific, MA, EUA) em plataforma *ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer* (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Por meio do sequenciamento da região flanqueadora da biblioteca inserida no DNA do fago, determinou-se a sequência do peptídeo obtidos após seleção por *phage display*.

### 3.7.2 Panning contra proteínas em solução.

Para a proteína E7, a seleção de ligantes mais promissora foi feita em suspensão, utilizando-se a estratégia de *phage display* em solução com captura por *beads* magnéticas. Para tal, 0,2 µg de E7 biotinizada foram individualmente incubados com 5 µl de cada uma das bibliotecas (X6 ou CX8C – 2x10<sup>9</sup> TU/µL) em volume final de 50 µl em TPI 3% BSA à TA por 1 h sob gentil rotação. Em seguida, 10 µl de *beads* magnéticas (*Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1*, ThermoFisher Scientific, MA, USA) previamente bloqueadas com BSA foram adicionados à solução e incubadas por 15 min sob gentil rotação. Como controle, os fagos também foram incubados apenas com BSA e submetidos ao mesmo procedimento. As *beads* foram imantadas com o *DynaMag™-2 Magnet* (ThermoFisher Scientific, MA, USA) para realização das lavagens. Foram realizadas 10 lavagens, sendo 7 delas com TPI 0,1% tween 20, 2 com TPI 3% BSA e uma somente com TPI. A E7 ligada nas *beads* foi ressuspendida

em 50 µl de TPI e infectada com 200 µl *E. coli K91kan* na DO ≈ 2,0. As demais etapas de plaqueamento, crescimento bacteriano e purificação dos fagos foram realizadas como descrito anteriormente. Foram realizados 4 ciclos de seleção, PCR de colônia dos fagos recuperados por infecção bacteriana e o sequenciamento dos 3º e 4º ciclos de seleção como descrito.

### **3.8 Análise da especificidade de ligação dos peptídeos selecionados às proteínas**

Os fagos selecionados na etapa de *panning* foram utilizados em ensaios de ligação às oncoproteínas GST-E6 e E7 a fim de confirmar a especificidade da interação. Após o sequenciamento de DNA e seleção dos fagos a serem testados, estes foram amplificados a partir do estoque de LB-glicerol e purificados pelo método de PEG/NaCl. Os fagos amplificados foram diluídos, submetidos à PCR e sequenciamento para confirmação da sequência obtida, e titulados para inferência das unidades transdutoras (TU).

#### *3.8.1 Ensaio de ligação de fagos às proteínas imobilizadas em placa.*

As proteínas GST-E6 e E7 foram individualmente imobilizadas em placas *high-binding* de 96 poços por 16 h a 4 °C. Para ensaios com GST-E6, foram imobilizados também GST e BSA como proteínas-controle, e para E7, apenas BSA. Os poços foram bloqueados com TPI 3 % BSA por 2 h à TA e incubados com 10<sup>9</sup> TU de cada fago a ser testado ou 10<sup>9</sup> TU do fago *Fd-tet* (selvagem) por 2 h à TA. Os fagos foram cultivados em LB-ágar e quantificados por contagem de colônia, com valores expressos em TU.

### 3.8.2 Ensaio de ligação de fagos à proteína em solução.

Incubou-se em solução  $10^8$  ou  $10^9$  TU dos fagos-teste ou do *Fd-tet* com 0,1 µg de E7, com Sintrofina (proteína-controle contendo cauda de histidina) ou com apenas BSA em TPI 3 % BSA. A proteína E7, o controle Sintrofina ou BSA foram incubadas com 5 µl de *beads* magnéticas de histidina (#10103, Thermofisher Scientific, MA, USA) por 15 min e imantadas para 10 lavagens com TPI 0,1% tween 20, TPI 3% BSA e TPI. A infecção e plaqueamento foram realizados como já descritos no ensaio de ligação em placa.

### 3.8.3 Curva de titulação de fagos

As proteínas GST e GST-E6 foram individualmente imobilizadas (1 µg / poço) em placa *high-binding* a 4 °C por 16 h, em seguida bloqueadas por 2 h com TPI 3% BSA. Diferentes concentrações de fagos individuais ou o fago controle *Fd-tet* (de  $10^5$  a  $10^9$  TU) foram adicionadas aos poços bloqueados, sendo incubadas por 2 h à TA. Após 10 lavagens com TPI, os fagos foram recuperados, diluídos e plaqueados como descrito anteriormente. O número de colônias foi utilizado para inferência do número de TU recuperados, estabelecendo-se a melhor concentração de fagos para maximizar a diferença entre ligante e controle para os ensaios de competição.

### 3.8.4 Ensaio de competição de fagos com proteínas em solução pela ligação com GST-E6 imobilizada em placa

A GST-E6 foi imobilizada (1 µg/poço) em placa *high-binding* a 4 °C por 16 h, bloqueadas com TPI 3% BSA por 2 h à TA e incubadas com  $10^8$  TU de fagos com 5 vezes de excesso molar de GST ou GST-E6 em duplicata. Após 2 h, os poços foram lavados 10 vezes com TPI e os fagos, recuperados por infecção bacteriana. As diluições e o plaqueamento foram realizados como descrito anteriormente para os ensaios de ligação.

### 3.8.5 Ensaio de competição de fagos com anticorpos em solução pela ligação à GST-E6 imobilizada em placa

A proteína GST-E6 foi imobilizada e bloqueada com TPI 3 % BSA por 2 h à TA e então incubada com  $10^8$  TU de fagos com anti-16E6 ou IgG de camundongo nas mesmas concentrações utilizadas na padronização do F-LISA (20 µg/ml) em duplicata. Como controle da ligação do fago à GST-E6, foi utilizada GST imobilizada em placa, submetida às mesmas condições. Após 2 h à TA, os poços foram lavados 10 vezes com TPI e os fagos que permaneceram ligados, recuperados por infecção bacteriana. O plaqueamento e contagem de colônias foi realizado como descrito anteriormente.

## 3.9 Peptídeos sintéticos

As sequências peptídicas previamente selecionadas e validadas nos ensaios por sua ligação à porção E6 da proteína de fusão GST-E6 foram encomendadas na forma de peptídeos sintéticos (95% de pureza, Chinese Peptide Company, Ltd., China). Os peptídeos sintéticos foram solubilizados em DMSO e posteriormente diluídos em tampão salino-fosfato (PBS: 2,7 mM KCl, 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 138 mM NaCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2) para a realização dos ensaios de competição destes com os fagos pela ligação à E6. Para tal, a proteína GST-E6 purificada foi imobilizada em placas de 96 poços, bloqueada com BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma-Aldrich, MI, EUA) e incubada com solução contendo  $10^7$  ou  $10^8$  unidades transdutoras (TU) de fagos e peptídeos em diversas concentrações. Como controles, foram utilizados o fago *Fd-tet* (sem inserto peptídico no capsídeo), um peptídeo não-relacionado (CARAC), a proteína BSA imobilizada, e fagos com apenas veículo (PBS com DMSO). Após 2 h de incubação, os poços foram lavados vigorosamente com PBS e os fagos ligados à GST-E6, recuperados por infecção bacteriana pela cepa de *E. coli k91kan*. As bactérias infectadas foram então plaqueadas em placas de LB-ágar contendo

canamicina (50 µg/ml) e tetraciclina (40 µg/ml) e incubadas a 37 °C por 16 h para contagem do número de colônias e inferência do número de TU recuperadas.

### **3.10 Análise do sítio de ligação dos peptídeos à E6**

#### *3.10.1 Deleções de domínios da E6*

Foram realizadas deleções gênicas nos vetores de expressão heteróloga de E6 e GST-E6, de maneira remover as sequências codificantes do C-terminal ( $\Delta$  1-80), N-terminal ( $\Delta$  81-151; C81->S) e do motivo de ligação à PDZ (PBM;  $\Delta$  145-151). Os vetores produzidos foram sequenciados para confirmar as deleções e garantir a correta matriz de leitura dos fragmentos da proteína. Após amplificação, os vetores foram inseridos na cepa bacteriana *RIL*, otimizada para expressão heteróloga de genes eucariotos por possuir plasmídeos para produção de tRNAs comuns em eucariotos (KLEBER-JANKE, BECKER, 2000). A expressão se deu por indução com 0,4 mM de IPTG e cultivo a 25 °C por 6 h, 250 rpm. Após análise da expressão e da solubilidade como previamente descrito, as proteínas obtidas foram purificadas por cromatografia de afinidade e dialisadas contra TPI. A proteína GST-E6 completa, a GST e os fragmentos purificados foram individualmente imobilizados em placa na concentração de 100 nM para ensaio de ligação de fagos, utilizando-se  $10^7$  TU de fagos por poço.

#### *3.10.2 Análises in silico*

As análises computacionais foram realizadas em colaboração com a Dra. Erika Piccirillo, pós-doutoranda do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Um modelo por homologia da estrutura da proteína E6 completa foi construído a partir das estruturas disponíveis no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), 6SJA e 4XR8 PDB utilizando-se as configurações padrão do programa *Modeller v.9.19* (ESWAR et

al., 2006). Para isso, foram utilizadas as estruturas do PDB supracitadas com adição do motivo PBM, alguns resíduos N-terminais que não foram resolvidos nestas estruturas e a reversão das mutações inseridas nas cisteínas não-conservadas para aumentar a solubilidade, com o objetivo de obter uma estrutura mais próxima à proteína E6 produzida fusionada à GST que foi utilizada na seleção e validação dos peptídeos (Fig.4). As sequências primárias da proteína E6 com e sem o domínio PBM foram alinhadas no *Clustal Omega* (SIEVERS et al., 2011) e 10 modelos foram gerados, com suas qualidades estereoquímicas avaliadas pela ferramenta *Structure Assessment do SWISS-MODEL Webserver* para seleção do melhor modelo para prosseguir com as análises (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011; MADEIRA et al., 2019). Após a escolha, o modelo teve sua estrutura minimizada pelo software GROMACS v.2020 (LINDAHL et al., 2020), na qual os resíduos básicos e o resíduo N-terminal foram protonados, os resíduos ácidos e o resíduo C-terminal foram desprotonados, e os resíduos de histidina foram mantidos na forma neutra. Os dois *zinc-fingers* presentes na proteína E6, formados cada um por 4 resíduos de cisteína desprotonados que coordenam com um átomo de  $Zn^{2+}$ , são essenciais para a manutenção da estrutura e foram incluídos no modelo pela utilização do campo de força *Amber99sb*, com parâmetros para o Zinco descritos por Macchiagodena e colaboradores (2020). A minimização desta estrutura se deu pelo programa GROMACS v.2020, com aplicação do modelo geral de solvente implícito de Born. A conformação inicial dos peptídeos foi gerada pela ferramenta PEP-FOLD3 (LAMIABLE et al., 2016), que gerou pelo menos 5 modelos para cada peptídeo. O modelo mais central dentre os gerados, ou seja, com menor RMSD (*Root-mean-square deviation of atomic positions*; desvio quadrático médio entre as posições dos átomos), foi utilizado como ponto de partida para simulações de dinâmica molecular,

após minimização usando o modelo geral de solvente implícito de Born. Todas as simulações foram feitas no programa NAMD v.2.12 (PHILLIPS et al., 2005) considerando o campo de força CHARMM36 (KLAUDA et al., 2010). A estrutura minimizada foi neutralizada por KCl (0,15 M) em um caixa com moléculas de água TIP3P com bordas a, pelo menos, 10 Å da superfície do peptídeo. Os comprimentos de todas as ligações foram restringidos utilizando-se o algoritmo de LINCS (HESS et al., 1997). O sistema foi equilibrado durante 1 ns em duas etapas: durante os primeiros 500 ps, restrições harmônicas foram aplicadas a todos os átomos do sistema, exceto aos das moléculas de água, utilizando uma constante de força igual a 1000 kJ/(mol × nm<sup>2</sup>). Nesta etapa, o sistema foi aquecido de 100 a 300 K em uma caixa de volume constante, com a redução gradativa das restrições harmônicas. Então, durante os 500 ps seguintes, todos os átomos do sistema puderam se mover livremente. O sistema foi tratado com condições periódicas de contorno utilizando-se interações eletrostáticas do tipo PME e aplicando valor de corte de 10 Å para interações do tipo *van der Waals*. Em uma caixa com pressão constante (1 atm) controlada, pela abordagem de Berendsen, a temperatura foi mantida constante usando termostato *V-rescale*. A simulação produtiva utilizou tempo de integração de 2 fs e sua trajetória foi registrada por 500 ns. Foram realizadas trajetórias para triplicadas independentes, agrupadas e analisadas pelo programa VMD v.1.9.3. (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). Nesta análise, os valores de RMSD foram calculados utilizando-se os átomos da cadeia principal em relação à estrutura usada como ponto de partida. Em seguida, o *frame* mais próximo da estrutura média foi selecionado e utilizado nos procedimentos de *docking* molecular. O *docking* foi realizado no programa HADDOCK 2.2 (VAN ZUNDERT et al., 2016), aplicando-se os parâmetros padrão e considerando a região próxima aos resíduos: 8, 10, 11, 14, 31,

32, 49, 51, 53, 54, 55, 67, 70, 71, 73, 74, 77, 78, 100, 102, 129 e 131 da E6. Neste protocolo, cada conformação do peptídeo foi ancorada sobre a superfície de cada conformação do receptor, resultando em um total de 270 corridas individuais. Para cada corrida, 1.000 poses (posições de interação molecular em determinado momento) iniciais foram geradas e as 200 melhores poses foram submetidas a duas etapas de refinamento: uma semiflexível e outra com solvente implícito. Por fim, as 200 poses foram agrupadas pelo método baseado na fração de contatos comuns, aplicando um valor de corte de 0,75. As estruturas de menor energia dos três grupos mais populosos foram então selecionadas e suas interações, analisadas utilizando-se a ferramenta PLIP (*Protein-Ligand Interaction*; (SALENTIN et al., 2015)).

### **3.11 Análise funcional dos peptídeos em linhagens celulares**

#### *3.11.1 Ensaio de internalização de peptídeos por citometria de fluxo*

Os peptídeos sintéticos foram desafiados em linhagens celulares para verificar sua capacidade de internalização espontânea nas células. As linhagens de carcinoma de células escamosas de colo uterino C33a (ATCC® HTB-31™; HPV negativa) e SiHa (ATCC® HTB-35™; HPV16 positiva) foram cultivadas em meio DMEM (Gibco™ *Dulbecco's Modified Eagle*, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) suplementado com 10 % de SFB (soro fetal bovino, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) a 37 °C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Para análise da internalização dos peptídeos, foram semeadas 5x10<sup>5</sup> células de cada linhagem em placas de 6 poços. Após 24h, os peptídeos FITC-A2, FITC-A10, FITC-Pen-A2, FITC-Pen (controle positivo de internalização) e FRW-FITC (controle negativo de internalização) foram adicionados aos poços em triplicata na concentração de 10 µM. Após 1 h de incubação, as células foram lavadas por 3 vezes com PBS e incubadas com 10 mg/ml de tripsina (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA)

por 10 min para remoção de peptídeos que pudessem estar aderidos inespecificamente à membrana celular (HABAULT et al., 2020). As células foram então lavadas mais uma vez e ressuspensas em PBS a 4 °C para leitura no citômetro de fluxo *Attune NxT™* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Durante a análise, foram captados 1000 eventos por replicata com *gate* inicial por tamanho para exclusão de debris celulares. Utilizando este *gate*, foram construídos histogramas da intensidade de detecção do sinal no canal do fluoróforo FITC (BL1-H) pela contagem normalizada de células (em porcentagem do total).

### 3.11.2 Ensaio de internalização de fagos por imunofluorescência

As células C33a e SiHa foram individualmente semeadas em lâminas de 8 poços (#BD354108 – *8 slides chamber glass slide*) e cultivadas em meio DMEM (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) suplementado com 10 % de SFB (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) a 37 °C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, foram bloqueadas com SFB por 1 h e incubadas com 2x10<sup>9</sup> TU de fagos em meio DMEM 2% SFB por 24 h. As células foram lavadas com PBS 10% BSA e incubadas com tampão glicina (50 mM glicina, 150 mM NaCl, pH 2,8) por 1 min. Procedeu-se a lavagem com PBS, fixação com PFA 4% e permeabilização das células com Triton X-100 0,2% em metade das amostras, sempre lavando com PBS entre as etapas. Após novo bloqueio com PBS 1% BSA por 2 h à TA, adicionou-se o anticorpo primário produzido em coelho (#B7786, *anti-Fd phage*, Sigma-Aldrich, MO, USA) na diluição 1:500 em PBS 1% BSA por 2 h. Como controle negativo, foi utilizado IgG de coelho não-imune. Procedeu-se, então, lavagens com PBS 1% BSA e incubação com anticorpo secundário 1:300 (#711-586-152, *Alexa Fluor® 594-AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG*, Jackson Laboratory, ME, USA) por 1h à TA protegido da luz. Os poços foram lavados com PBS 1% BSA, fixados novamente com PFA 4%. As amostras não permeabilizadas

anteriormente foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1%. A coloração dos núcleos foi realizada com DAPI, os poços foram novamente lavados com PBS e com água milli-Q, e a câmara superior foi retirada, liberando as lâminas para montagem com meio especializado para fluorescência (#H1000, *VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium*, Vector Laboratories, CA, USA). Após secagem, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (*EVOS FLoid*, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

### 3.11.3 Ensaio de viabilidade celular

O efeito do tratamento com peptídeos sobre a atividade metabólica das células foi analisado pela reação colorimétrica do reagente WST-1 (Sigma-Aldrich, MI, EUA). Foram utilizadas 5 linhagens celulares: C33a e SiHa, já descritas, SCC90 (ATCC® CRL-3239™, HPV 16-positiva, proveniente de carcinoma de células escamosas de cavidade oral), HeLa (ATCC® CRM-CCL-2™, HPV 18-positiva, proveniente de adenocarcinoma de colo uterino) e HEK293T (ATCC® CRL-3216™, HPV-negativa, células embrionárias de rim humano), semeadas na concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços, aguardando-se 24 h para completa adesão celular. O ponto basal do ensaio (0 h) foi definido pela adição do reagente WST-1 nas células sem peptídeo no primeiro dia, no qual foram testadas diversas condições para definição do protocolo de incubação por 3 h a 37 °C e leitura da absorbância em *espectofotômetro xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer* (Bio-Rad, CA, USA) a 450 nm. Os peptídeos FITC-A2, FITC-A10, FITC-Pen-A2 e CARAC foram administrados diariamente na concentração de 10 µM e o reagente WST-1 foi utilizado da mesma maneira estabelecida para o ponto basal, com leituras em 24 h, 48 h, 72 h e/ou 96 h. Todas as condições foram testadas em triplicada e normalizadas pela medida dos poços contendo apenas meio e WST-1. Então, as medidas de

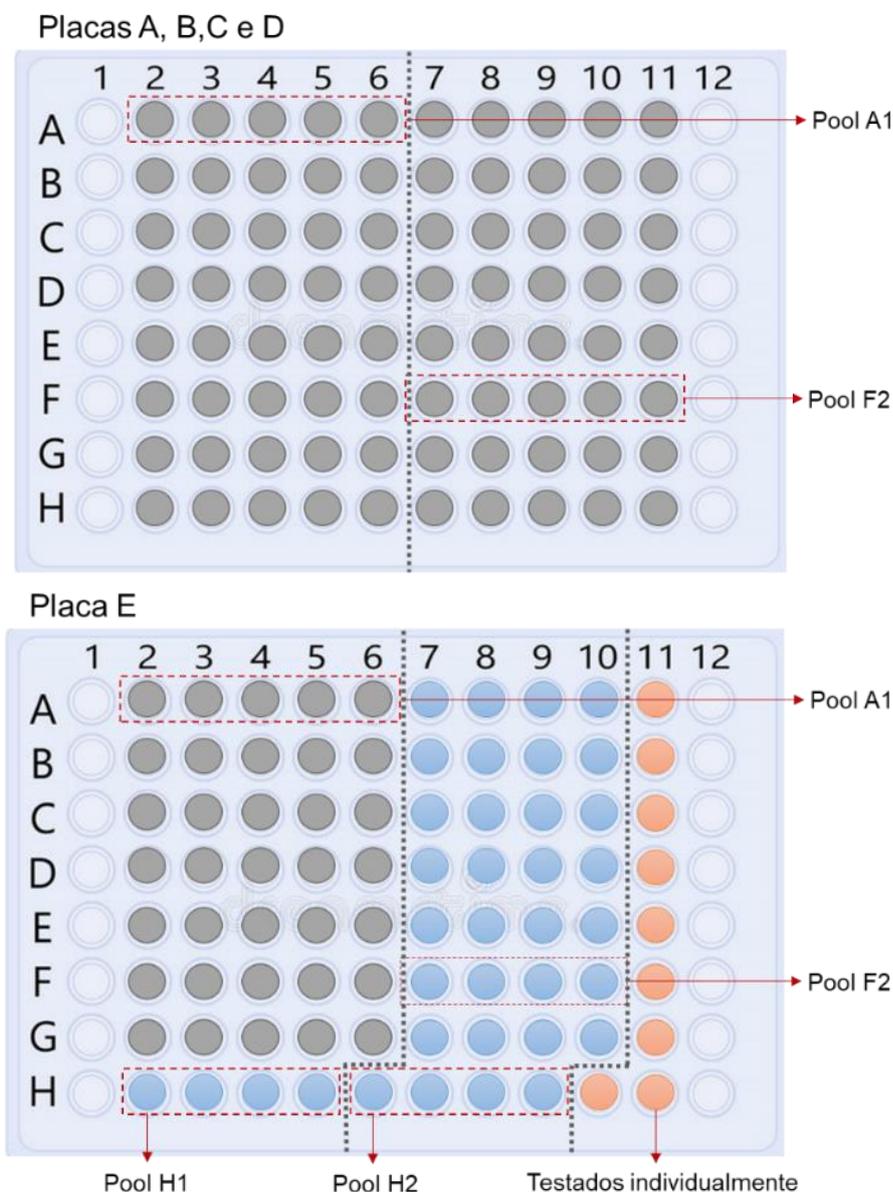
absorbância obtidas foram utilizadas para inferir o número de células viáveis presentes em cada poço por comparação ao ponto basal.

### **3.12 Varredura do banco de compostos *Pandemic Response Box***

#### **3.12.1 Varredura do banco de compostos em pools**

O “*Pandemic Response Box*”, um banco de 400 compostos disponibilizado pela iniciativa *Medicines for Malaria Venture* (MMV; <https://www.mmv.org/mmv-open/pandemic-response-box>), foi requisitado para teste de competição dos compostos com o fago A2 pela ligação à E6. Os compostos foram recebidos na forma liofilizada em placas de 96 poços, divididos em 5 placas de 80 compostos cada. Foram solubilizados em DMSO na concentração de 10 mM como recomendado pelo MMV. A fim de otimizar e agilizar a busca, os compostos foram concatenados em 10 combinações ou *pools* de 4 ou 5 compostos cada (Figura 6). Onze compostos da placa E, cuja concentração era de 2 mM após solubilização, foram testados individualmente (em vermelho, figura 6) Após testes preliminares para definição da concentração máxima de DMSO permitida no ensaio de competição de fagos e concentração ideal de compostos e fagos a ser utilizada, os *pools* foram testados na concentração de 10  $\mu$ M de cada composto (50  $\mu$ M de compostos no total) em duplicata em ensaios de competição com  $10^6$  TU do fago A2.

Figura 6 – Desenho esquemático da construção dos *pools* para *screening* do *Pandemic Response Box*.



Os *pools* foram construídos pela combinação de compostos da mesma placa e mesma fileira. Cada fileira resultou em 2 *pools*. Para os compostos com concentração inicial de 10mM (representados em cinza), foram feitos pools com 5 $\mu$ l de cada composto, resultando em pools com 2mM de cada composto. Alguns pools foram construídos pela combinação de 4 compostos (azuis), com concentração final de 2,5 mM de cada composto. Os compostos representados por círculos laranja (inferior, placa E) foram adquiridos na concentração de 2 mM e foram testados individualmente.

O peptídeo A2 foi utilizado como controle de competição na mesma concentração dos compostos. Os ensaios foram realizados como descrito anteriormente para a competição entre fagos e peptídeos. As bactérias sujeitas à infecção para recuperação dos fagos ligados à GST-E6 foram plaqueadas em quadruplicata, com o

número de colônias utilizado para inferência do número de TU recuperadas. Os valores obtidos foram normalizados pela média do controle sem DMSO (- DMSO = 100%). Os pools com atividade inibitória na competição tiveram seus compostos testados individualmente.

### 3.12.2 Teste dos compostos selecionados em células

Os compostos que apresentaram competição com o fago A2 pela ligação à E6 foram administrados às linhagens celulares para avaliação da atividade dos compostos sobre a viabilidade celular pelo ensaio de WST-1, como descrito anteriormente para os peptídeos (item 3.11.3). Para reduzir a concentração de DMSO utilizada, os compostos D10, E08 e E09 foram novamente enviados em sua forma liofilizada pela MMV, solubilizados e utilizados nos ensaios celulares.

## 3.13 Análise estatística

Os resultados dos ensaios de ligação e competição de fagos foram submetidos à análise de variância de um (*one-way*) ou dois fatores (*two-way ANOVA*), com pós-teste para comparação múltipla ( $\alpha=0,05$ ) considerando a melhor aplicação para o desenho experimental e o teste realizado. A análise da curva dose-resposta da competição dos peptídeos com os fagos pela ligação à E6 foi realizada por ajuste não-linear com *slope* variável do *log* da concentração do peptídeo contra a resposta normalizada pelo controle. Para análise dos ensaios de competição com os compostos do *Pandemic Response Box*, foram considerados relevantes os *pools* cujas duplicatas ficaram abaixo do *cut-off* estabelecido de um desvio padrão em relação à média dos controles (poços contendo o fago A2 com e sem DMSO). Os dados foram representados pela média com erro padrão (SEM). Foi utilizado o software *GraphPad Prism* versão 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, CA, USA).

**Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho.**

Nome	Sequência	Tamanho do fragmento	Aplicação
E6-Fw-XhoI	5'-TGA CTGAGCACCAAAAGAGAACTGCAATGTT-3'	492 pb	Clonagem de E6 no vetor pAE
E6-Rv-HindIII	5'-TGAAAGCTTTTACAGCTGGGTTTCTCTACGTG-3'		
E7-Fw-XhoI	5'-TGA CTGAGCATGGAGATACACCTACATTGCAT-3'	312 pb	Clonagem de E7 no vetor pAE
E7-Rv-HindIII	5'-TGAAAGCTTTTATGGTTTCTGAGAACAGATGGG-3'		
T7-Fw	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	E6: 655 pb	Verificação do inserto no vetor pAE
T7-Rv	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'.	E7: 475 pb	
pGEX-SeqF1	5'-GAGCTGTTGACAATTAATCATCGGC-3'	790 pb	Sequenciamento do vetor pGEX-2T:16E6
pGEX-SeqR1	5'-GGTCCTGAAACATTGCAGTTCTCT-3'		
pGEX-SeqF2	5'-GGTGGCGACCATCCTCCAA-3'	599 pb	Sequenciamento do vetor pGEX-2T:16E6
pGEX-SeqR2	5'-CGGGAGCTGCATGTGTCAGAG-3'		
PhagePCR-F2	5'-GATGGTTGTTGTCATTGTCGGCG-3'	Aprox. 450 pb	Determinação da sequência apresentada pelos fagos
PhagePCR-R1	5'-CAGAGCCACCACCCTCATTTTCAG-3'.		
GST-E6C-F	5'-GGATCCTATAGTTTGTATGGAACAACATTAG -3'	5.160pb *	Deleção do domínio N-terminal da E6
GST-E6C-R	5'- CTATAGGATCCACGCGGAACCAG -3'		
GST-E6N-F	5'- CATTATTAAGAATTCATCGTGACTG -3'	5.187 pb *	Deleção do domínio C-terminal da E6
GST-E6N-F	5'- ATTCTTAATAATGTCTATACTCACTAATTTT -3'		
GST-E6ΔPBM-F	5'- CAAGATAAGAATTCATCGTGACTGACTG -3'	5.382 pb *	Deleção do domínio PDZ da E6
GST-E6ΔPBM-R	5'- ATTCTTATCTTGATGATCTGCAACAAGAC -3'		

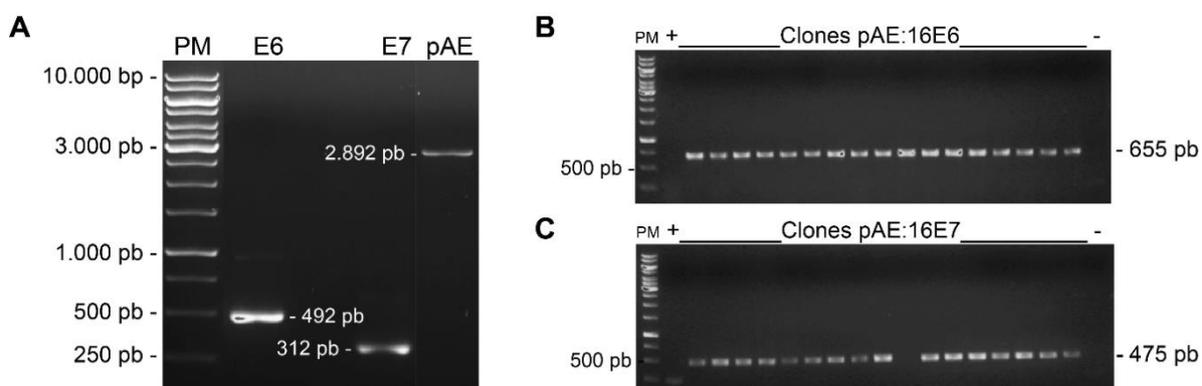
pb = pares de base; \*todo o vetor foi amplificado, excluindo-se apenas as porções deletadas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Primeiro passo: a produção de E6 e E7 recombinantes

Para proceder a busca por ligantes das oncoproteínas de HPV16, E6 e E7 foram produzidas por expressão heteróloga em *E. coli*. Inicialmente, os genes de interesse foram subclonadas no vetor pAE (Figura 7) e sequenciados para confirmar a presença do gene de interesse sem mutações.

Figura 7 – Clonagem de E6 e E7.



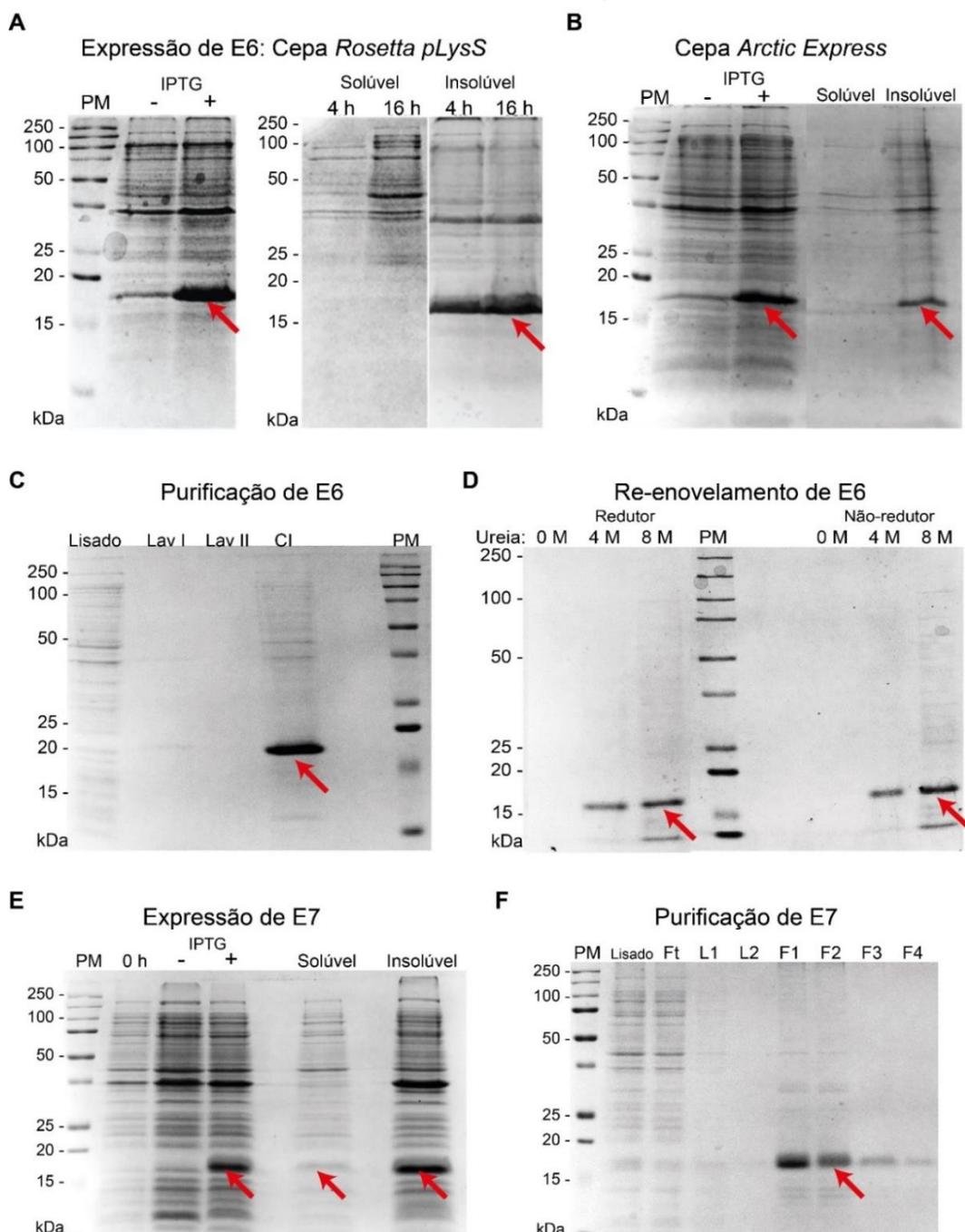
**A.** Os genes de E6 e E7 de HPV 16 foram amplificados por PCR a partir do genoma completo do vírus e o vetor pAE, amplificado por preparação plasmidial e linearizado por digestão com a enzima XhoI. **B e C.** Fragmentos obtidos por PCR de colônia para confirmação da clonagem de E6 (**B**) e E7 (**C**) de HPV 16 no vetor pAE. O vetor sem inserto foi utilizado como controle positivo (+). Eletroforese em gel de agarose 1,5%. PM= marcador de peso molecular.

Após a clonagem e confirmação da sequência correta de E6 e E7, os plasmídeos foram transformados em cepas de expressão, induzidas com IPTG para a produção das proteínas recombinantes. A proteína E6 foi expressa nas cepas *Rosetta pLysS*, que contém plasmídeos de tRNA complementares para otimizar a expressão de genes heterólogos, e na cepa *Arctic Express*, cuja co-expressão de chaperonas auxilia no enovelamento de proteínas normalmente expressas em células eucariotas (Figuras 8 A e B). Em ambas, a proteína E6 foi obtida apenas em sua forma insolúvel. Assim, procedeu-se a purificação das proteínas presentes em corpo de

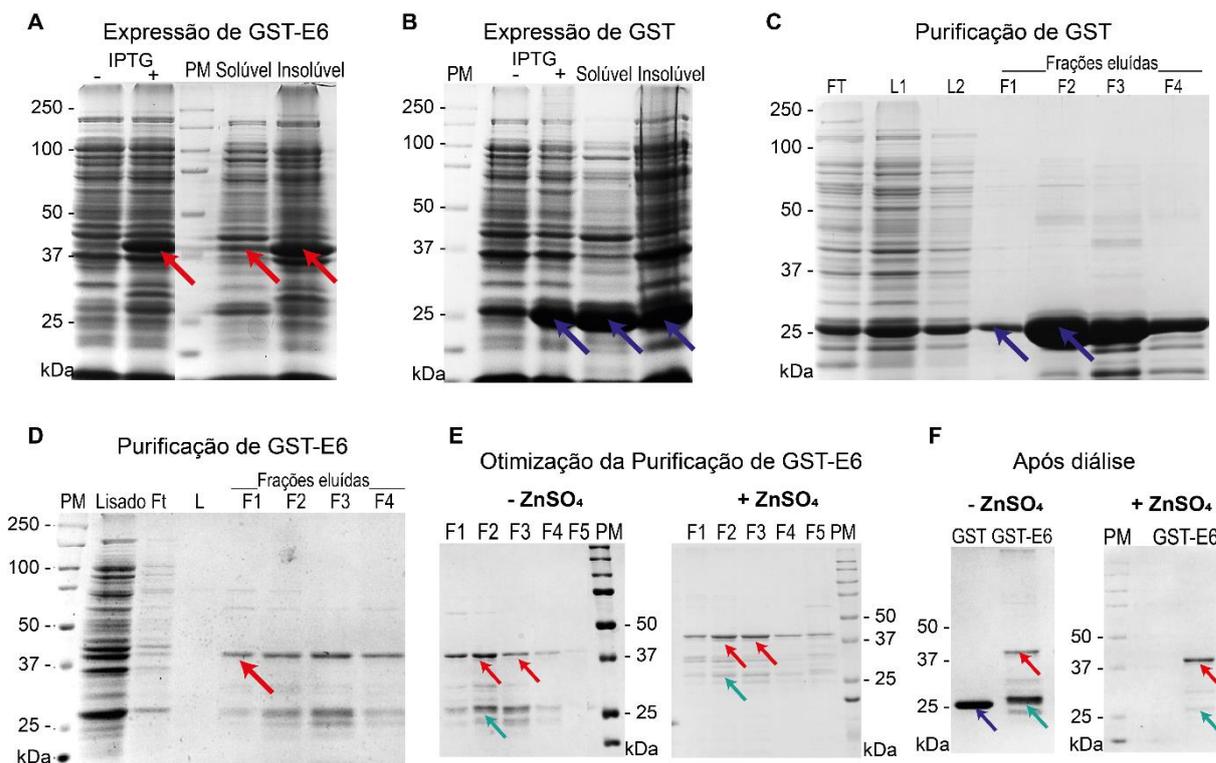
inclusão seguida de tentativas de re-enovelamento por diluição infinita ou diálise seriada, ambas sem sucesso (Figura 8 C e D). A proteína E7, por sua vez, foi obtida na forma solúvel durante a expressão bacteriana, purificada por cromatografia de afinidade em coluna de  $\text{Ni}^{2+}$  e dialisada (Figura 8 E e F). Embora tenha aproximadamente 11 kDa, a E7 migra em tamanho próximo a 18 kDa na eletroforese devido a sua carga líquida negativa (ARMSTRONG; ROMAN, 1993).

Para contornar a dificuldade de produção da proteína E6 na forma solúvel, um plasmídeo contendo o gene da proteína E6 de HPV16 à jusante do gene da proteína GST foi cedido pelo Dr. Lawrence Banks (ICGEB, Trieste, Itália), cujo grupo validou funcionalmente a proteína de fusão GST-E6 resultante desta construção plasmidial (BOON et al., 2015). Assim, foi possível obter a proteína de fusão GST-E6 na forma solúvel (Figura 9 A) e purificá-la por cromatografia de afinidade à glutathiona (Figura 9 D). A produção de GST-E6 foi otimizada pela adição de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) ao meio de cultura durante a expressão (Figura 9 E), com o objetivo de favorecer a correta conformação dos dedos de zinco (“*zinc fingers*”) que fazem parte da estrutura desta proteína. Além disso, o uso de inibidores de protease após a diálise da proteína aumentou a estabilidade desta durante o armazenamento (Figura 9 F). A proteína GST também foi expressa em *E. coli* e purificada da mesma maneira para ser utilizada como controle nos experimentos (Figura 9 B e C).

**Figura 8 – Expressão, solubilidade e purificação das proteínas E6 e E7.**



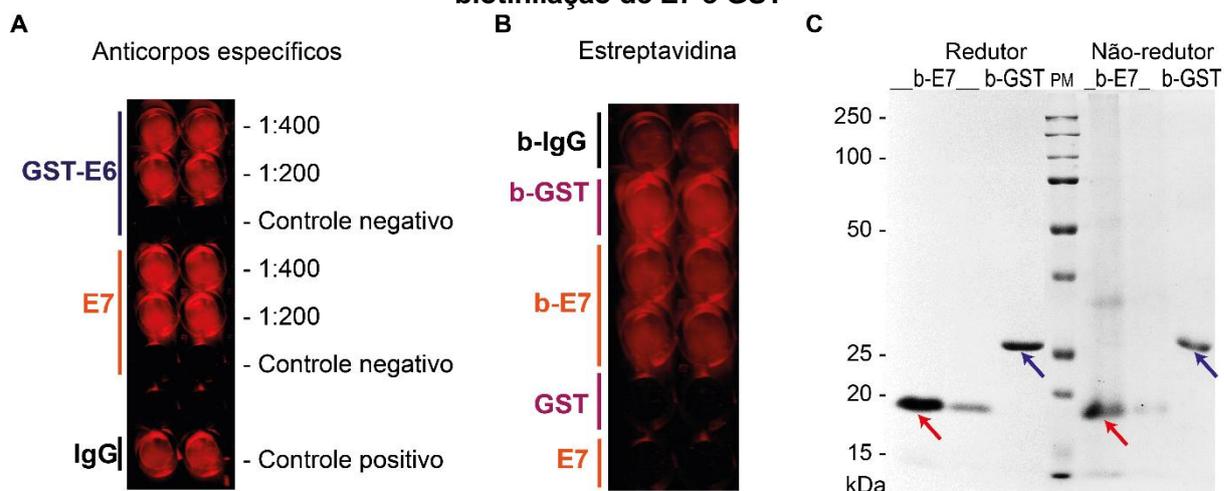
**A.** Expressão e teste de solubilidade de E6 nas cepas de *E. coli Rosetta™ PlysS* (A) antes (-) e 4 h ou 16 h após (+) indução com 1 mM IPTG, cultivadas a 37 °C, 200 rpm. **B.** Expressão e teste de solubilidade de E6 nas cepas de *Arctic Express™* antes (-) e 24 h após (+) a indução com 1 mM IPTG, cultivadas a 13 °C, 200 rpm. **C.** Purificação de corpo de inclusão, com destaque para a quantidade de proteína com peso molecular correspondente à E6 (seta vermelha) na etapa final de purificação (8 M de ureia). Lav = lavagem; CI = corpo de inclusão. **D.** E6 solúvel obtida nas etapas do processo de re-enovelamento da proteína insolúvel por diálise seriada. **E.** Expressão e teste de solubilidade da proteína E7 na cepa de *E. coli Rosetta™ PlysS* antes (-) e 6 h após a indução com 1 mM IPTG, cultivadas a 30 °C, 200 rpm. **F.** Purificação da proteína E7 em sua forma solúvel por cromatografia de afinidade em coluna de Ni<sup>2+</sup>. Ft = *flow-through* da coluna de Ni<sup>2+</sup>, L = lavagem, F = frações eluídas. **A-F:** SDS-PAGE em gel de poliácridamida 15%. As setas indicam as proteínas E6 (peso molecular próximo a 20 kDa) e E7 (peso molecular próximo a 12 kDa, mas conhecida por migração anômala próxima a 18 kDa). PM = marcador de peso molecular.

**Figura 9 – Expressão, solubilidade e purificação de GST-E6 e GST.**

**A e B.** Expressão de E6 fusionada à GST (**A**) e GST (**B**) em células *E. coli Rosetta™ PlysS* antes (-) e após (+) indução com 0,4 mM IPTG. Teste de solubilidade de GST-E6 (**A**) e GST (**B**) em células bacterianas lisadas para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (*pellet* ressuspendido em Ureia 8 M). **C e D.** Purificação de GST-E6 e GST por cromatografia de afinidade. GST-E6 (**C**) e GST (**D**) foram individualmente purificadas em coluna de glutationa e eluídas com 20 mM de glutationa reduzida em quatro frações (F1-F4). **E.** Otimização da purificação de GST-E6 em coluna de glutationa pela adição de sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) durante a expressão em sistema bacteriano. Frações eluídas com 20 mM de glutationa reduzida em cinco frações (F1-F5). **F.** GST e GST-E6 purificadas e dialisadas com adição de inibidor de protease para aumentar a estabilidade da proteína em solução. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. As setas vermelhas exemplificam bandas correspondentes à proteína de fusão GST-E6 (peso molecular próximo a 37 kDa) e setas azuis correspondem à proteína GST (aprox. 25 kDa). PM = marcador de peso molecular; Ft = *flow-through* da coluna de GST; L = lavagens; f = frações eluídas.

As proteínas GST-E6 e E7 produzidas por expressão heteróloga foram reconhecidas por anticorpos específicos contra E6 e E7 de HPV16 (Figura 10 A). As proteínas E7 e GST foram submetidas à biotinição, confirmada por meio do reconhecimento por estreptavidina marcada com fluóroforo (Figura 10 B). Após a biotinição, a integridade das proteínas foi confirmada por SDS-PAGE (Figura 10 C).

**Figura 10 – Detecção de GST-E6 e E7 por anticorpos específicos e confirmação da biotilação de E7 e GST**



. **A.** As proteínas GST-E6 e E7 imobilizadas, incubadas com anticorpos específicos e reveladas pela incubação com anticorpo secundário marcado com fluoróforo. IgG comercial de camundongo foi utilizada como controle positivo e as proteínas sem anticorpo específico, como controle negativo. **B.** A proteína E7 foi biotilada, imobilizada em placa e incubada com estreptoavidina marcada com o fluoróforo. Como controle negativo, foram utilizadas as proteínas não biotiladas. **A e B.** A detecção foi realizada em leitor infravermelho (*Odyssey® Imaging System, LI-COR*) com  $\lambda = 700$  nm em qualidade média e intensidade de 6,0. **C.** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15%. As setas vermelhas exemplificam bandas correspondentes à proteína E7 (migração anômala a 18 kDa) e as setas azuis, à GST (aproximadamente 25 kDa). PM = marcador de peso molecular.

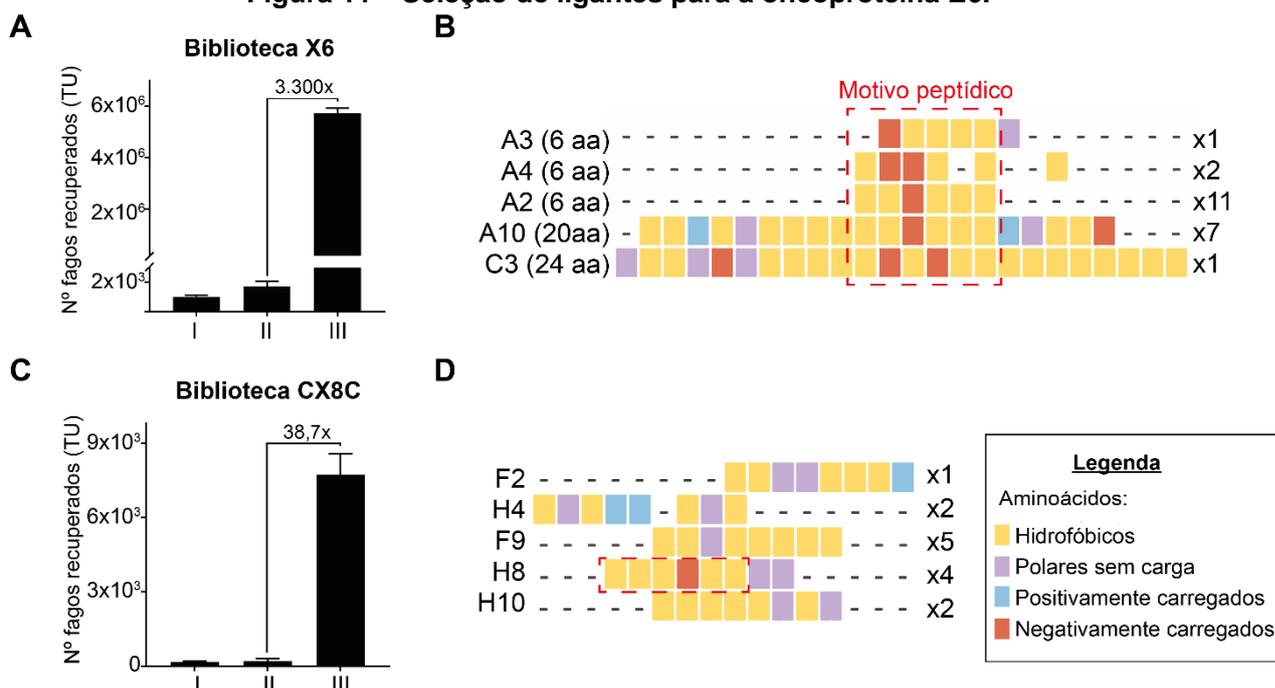
## 4.2 Seleção de ligantes para as oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16

Diversas abordagens para a seleção de ligantes para as oncoproteínas E6 e E7 foram testadas neste estudo, dentre elas: diferentes protocolos de recuperação de fagos em ensaios com proteína imobilizada em placa, tentativas de seleção de ligantes com proteínas em solução, utilizando *beads* magnéticas de afinidade por histidina, *beads* de estreptavidina, ou resina de  $Ni^{2+}$  para a recuperação da proteína contendo fagos ligantes. Serão apresentadas abaixo duas abordagens, uma para cada oncoproteína, consideradas as mais promissoras para cada caso. Em todos os experimentos, foram utilizadas as bibliotecas X6 e CX8C construídas em nosso laboratório (BEPPLER et al., 2016; MICHALOSKI et al., 2016). Enquanto a primeira apresenta 6 resíduos aleatórios, a segunda apresenta 8 resíduos aleatórios

circundados por duas cisteínas, que formam pontes dissulfeto e alteram a conformação espacial do peptídeo apresentado.

A seleção de ligantes para GST-E6 se deu pela imobilização desta proteína em placa, seguida de incubação com cada biblioteca individualmente, lavagem e posterior eluição ácida de fagos restantes com tampão glicina. Antes de cada ciclo de incubação com GST-E6, as bibliotecas foram incubadas com GST em um processo denominado de clarificação, que tem por objetivo sequestrar os fagos que apresentam sequências com afinidade por GST e, assim, evitar falsos positivos no processo de seleção. Por meio desta abordagem, após três ciclos de seleção, obtivemos enriquecimento de 3.300x no número de fagos recuperados para a biblioteca X6 (Figuras 11 A). Após o sequenciamento, metade das sequências apresentadas pelos fagos recuperados da biblioteca X6 eram idênticas, sugestivo de seleção. Esta sequência, denominada de A2, embora não compartilhe a sequência primária exata com os demais fagos encontrados, apresenta um motivo peptídico caracterizado por um aminoácido negativamente carregado flanqueado por aminoácidos hidrofóbicos, como mostra o esquema da figura 11 B. Curiosamente, duas das sequências eram maiores do que o esperado para a biblioteca X6, apresentando 20 e 24 aminoácidos. Os fagos recuperados após três ciclos de seleção da biblioteca CX8C apresentaram enriquecimento de 38,7x e algumas sequências repetidas, sendo que uma delas compartilha parcialmente características físico-químicas com o motivo encontrado em A2 (destaque em vermelho, figura 11 D).

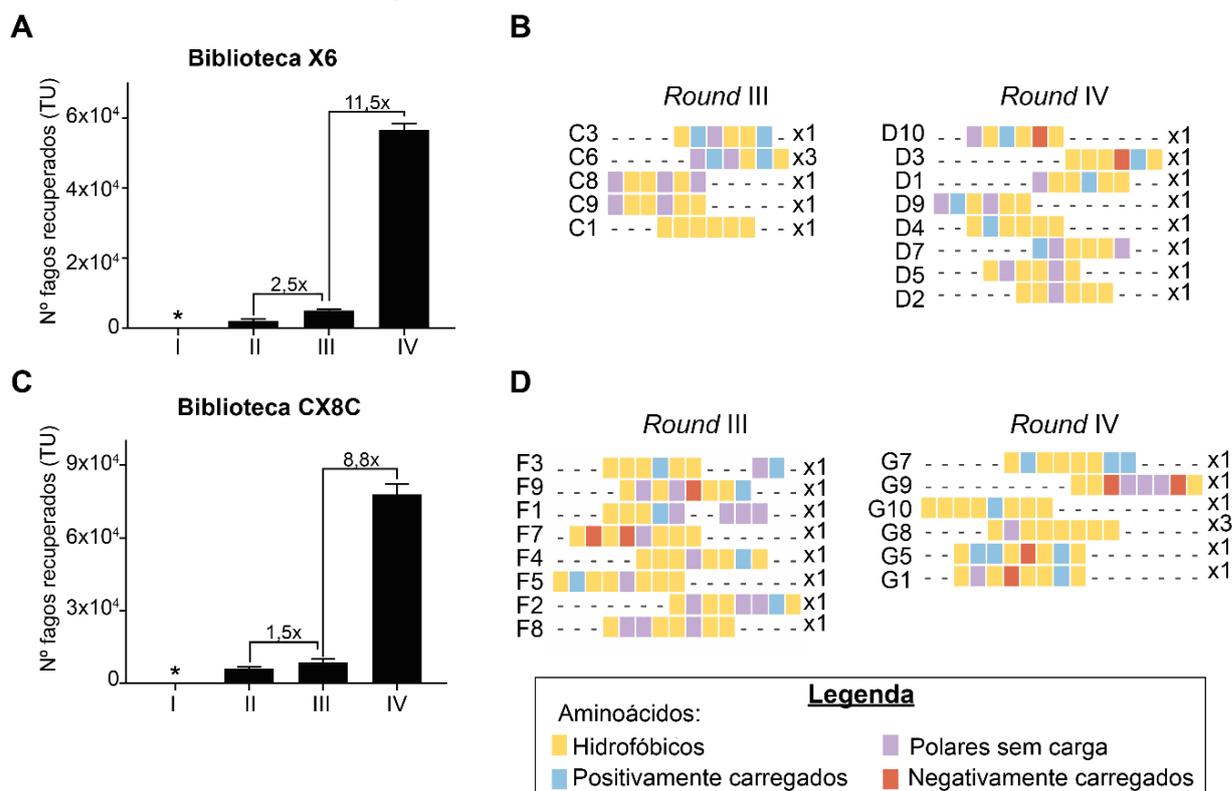
**Figura 11 – Seleção de ligantes para a oncoproteína E6.**



A proteína GST-E6 foi imobilizada em placa e incubada com as bibliotecas X6 e CX8C previamente clarificadas em GST. **A, C.** A média do número de unidades transdutoras (TU) de fagos recuperados em cada ciclo de seleção foi comparada para inferência do enriquecimento das sequências entre os ciclos. Valores representados pela média  $\pm$  SD. **B, D.** Desenho esquemático das sequências encontradas após três ciclos de seleção.

Para a proteína E7, foram realizados *pannings* com a proteína em solução e posterior captura por *beads* magnéticas. Assim, a E7 biotinizada foi incubada com as bibliotecas e capturadas por *beads* de estreptavidina, para lavagem e remoção de fagos inespecíficos e finalmente recuperação dos fagos ligantes por infecção bacteriana. Foram obtidos enriquecimentos de 2,5x e 11,5x para o terceiro e o quarto ciclos de seleção com a biblioteca X6. Apenas no terceiro ciclo foi obtida uma sequência que apareceu três vezes durante o sequenciamento, mas que foi perdida no ciclo posterior de seleção. Já para a biblioteca CX8C, o enriquecimento no terceiro e no quarto ciclos de seleção foi de 1,5x e 8,8x, obtida uma sequência repetida após o último ciclo (Figura 12).

**Figura 12 – Seleção de peptídeos ligantes para a oncoproteína E7**



. A proteína E7 biotinizada foi incubada com as bibliotecas X6 e CX8C em solução e posteriormente capturada por *beads* magnéticas conjugados com estreptavidina para recuperação dos fagos ligados à proteína. **A, C.** A média do número de unidades transdutoras (TU) de fagos recuperados em cada ciclo de seleção foi comparada para inferência do enriquecimento das sequências entre os ciclos. Valores representados pela média  $\pm$  SD. (\*) indica os fagos que não foram quantificados no primeiro ciclo para evitar a perda de sequências únicas e o comprometimento a seleção eficiente de ligantes. **B, D.** Desenho esquemático das sequências encontradas após três ou quatro ciclos (*rounds*) de seleção, com destaque para as características físico-químicas dos resíduos que compõe os peptídeos selecionados.

### 4.3 Análise da especificidade de ligação dos fagos à E6

Os fagos cujas sequências se repetiram e alguns outros foram escolhidos para amplificação e precipitação, a fim de serem testados para a especificidade de ligação às oncoproteínas. Para GST-E6, os fagos A2, A10 e C3 da biblioteca X6 apresentaram alta especificidade, enquanto o fago F9, pertencente à biblioteca CX8C, em oposição, apresentou ligação também à GST (Figura 13). Para a realização dos ensaios de especificidade de ligação de fagos à E7, foram testadas diversas abordagens, como o uso de *beads* com afinidade à cauda de histidina presente nesta proteína. Porém,

em nenhum dos casos foi possível demonstrar a especificidade dos fagos encontrados no *panning* pela proteína E7 (Figura 14).

**Figura 13 – Especificidade de ligação de fagos selecionados por phage display à GST-E6 por ensaio de ligação.**

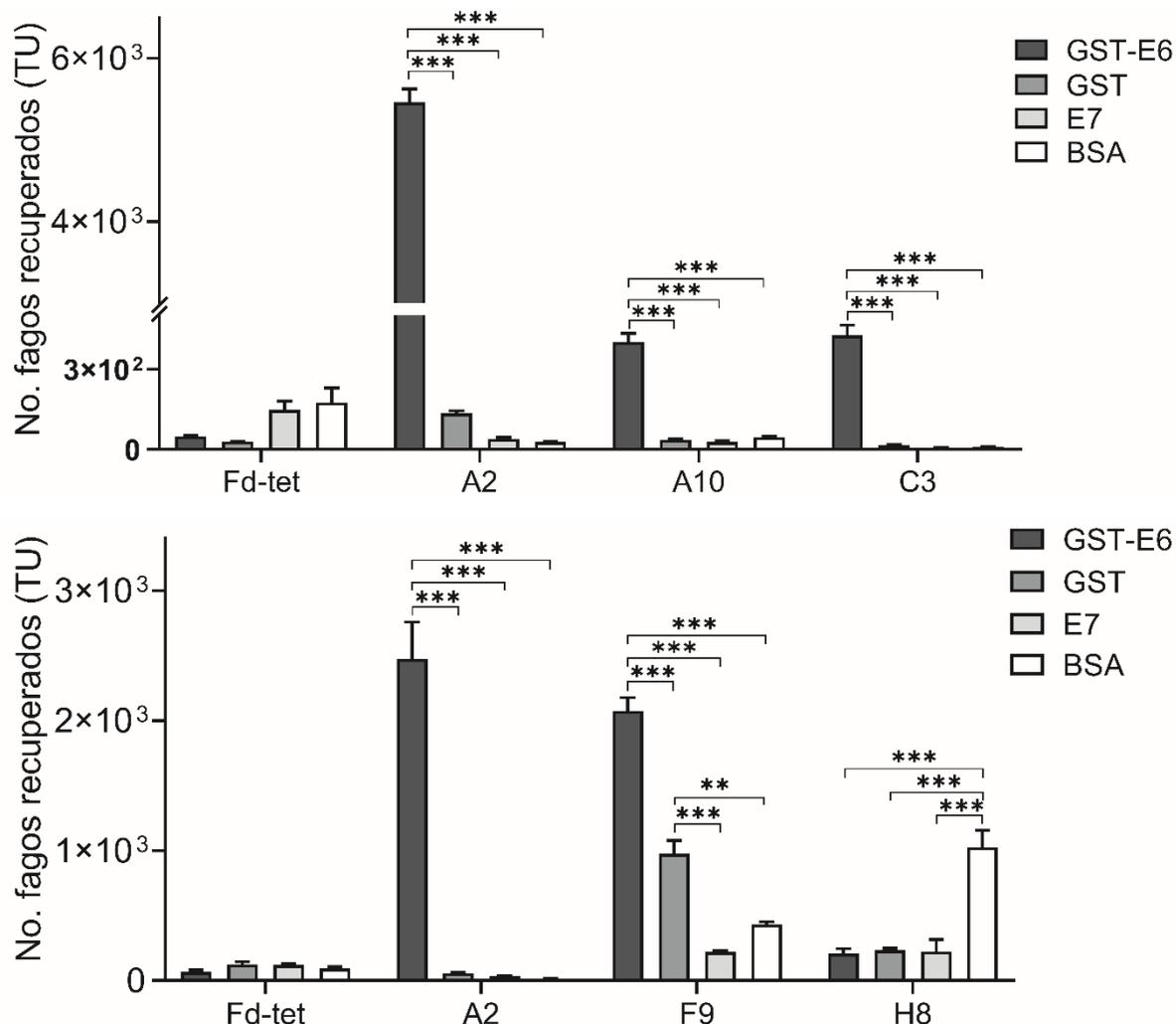


Gráfico representativo de ensaios de ligação de fagos selecionados por *phage display* e amplificados para determinação da especificidade de ligação à GST-E6. Os fagos foram incubados individualmente com GSTE6, GST, E7 ou BSA imobilizadas em placa. O número de unidades transdutoras de fagos recuperados foi comparada entre as proteínas e entre o fago-teste e o fago selvagem. Valores representados pela média e erro padrão (SEM). *Two-way ANOVA* com pós-teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,001$ .

**Figura 14 – Especificidade de ligação de fagos selecionados por *phage display* à E7 por ensaio de ligação.**

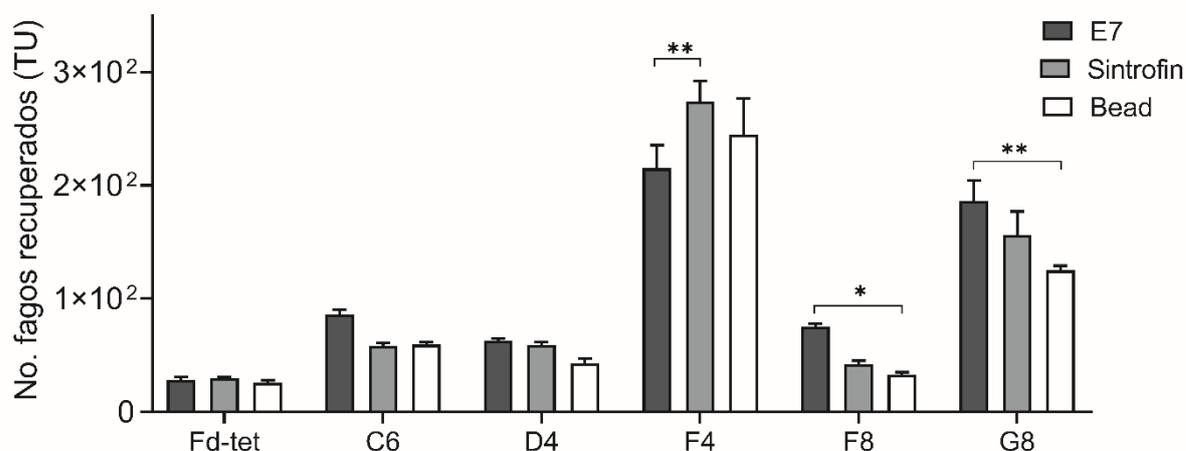
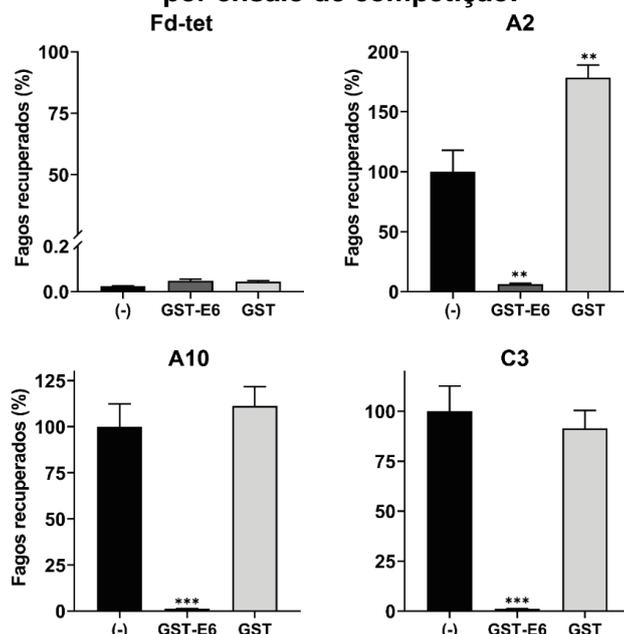


Gráfico representativo de ensaios de ligação de fagos selecionados por *phage display* e amplificados para determinação da especificidade de ligação à E7. Os fagos foram incubados individualmente com E7 ou Sintrofina (proteína controle) em solução, capturadas por *beads* de afinidade à histidina. As *beads* sem proteína também foram incubadas com fagos como controle. O número de unidades transdutoras de fagos recuperados foi comparada entre as proteínas, entre elas e as *beads*, e entre o fago-teste e o fago selvagem. Valores representados pela média e erro padrão (SEM). *Two-way ANOVA* com pós-teste de Dunnet, \*\* $p < 0,002$ ; \* $p < 0,05$ .

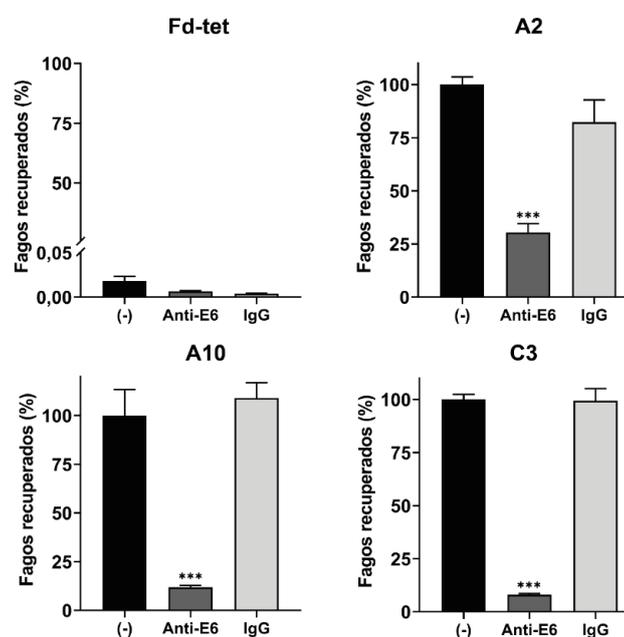
A fim de confirmar a especificidade de ligação dos fagos à porção E6 da proteína de fusão GST-E6, os fagos A2, A10 e C3 foram submetidos à competição com proteínas em solução e com anticorpos específicos. GST-E6 em solução, mas não GST, foi capaz de deslocar a ligação dos fagos à GST-E6 imobilizada em placa (Figura 15). Da mesma maneira, apenas o anticorpo específico para E6 de HPV16 (Anti-16E6) foi capaz de competir com os fagos A2, A10 e C3 pela ligação à GST-E6 imobilizada em placa, enquanto IgG de camundongo não demonstrou efeito sobre o reconhecimento da proteína imobilizada pelos fagos (Figura 16).

**Figura 15 – Especificidade de ligação de fagos selecionados por *phage display* à GST-E6 por ensaio de competição.**



Ensaio de ligação de fagos à proteína E6-GST immobilizada na presença ou ausência de um excesso molar (5x) de GST-E6 ou GST solúvel. O número de unidades transdutoras de fagos recuperados foi normalizado em relação à média de TU recuperadas sem competição (-). Valores representados pela média e erro padrão (SEM). Resultado de três experimentos com resultados similares. One-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. \*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,001$ .

**Figura 16 – Especificidade de ligação de fagos selecionados por *phage display* à GST-E6 por ensaio de competição.**

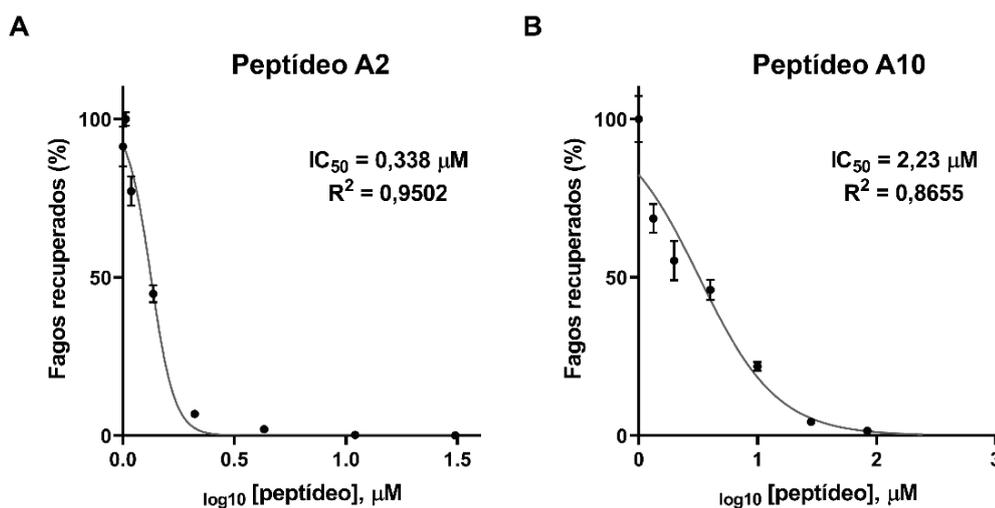


Ensaio de ligação de fagos à proteína E6-GST immobilizada na presença ou ausência de anticorpos específicos contra a E6 de HPV 16 ou de IgG de camundongo (controle negativo). O número de unidades transdutoras de fagos recuperados foi normalizado em relação à média de TU recuperadas sem competição (-). Valores representados pela média e erro padrão (SEM). Resultado de três experimentos com resultados similares. One-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. \*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.4 Análise funcional de A2 e A10 como peptídeos sintéticos

As sequências peptídicas apresentadas pelos fagos A2 e A10 foram encomendadas na forma de peptídeos sintéticos para dar seguimento à investigação do potencial inibitório destes peptídeos sobre a E6. Assim, foram inicialmente encomendadas as sequências de A2 e A10 precedidas de três resíduos encontrados nos fagos: um ácido aspártico, uma glicina e uma alanina (DGA), marcadas na extremidade amino-terminal com Isotiocianato de fluoresceína (FITC). A sequência A2 precedida da sequência da Penetratina, um peptídeo de penetração celular, também foi encomendada com marcação por FITC. Os peptídeos FITC-A2 e FITC-A10 foram capazes de competir com o fago correspondente de maneira dose-resposta em concentrações molares baixas, sendo FITC-A2 com “IC<sub>50</sub>” inferior à 0,5 μM e FITC A10, por volta de 2 μM, considerando a inibição de 10<sup>8</sup> unidades transdutoras de fago (Figura 17).

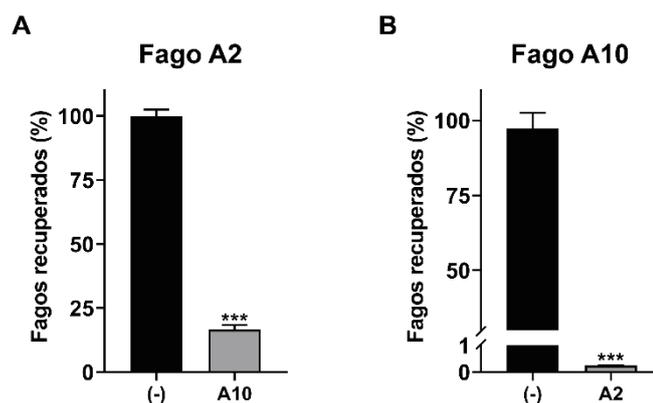
**Figura 17 – Curva dose-resposta da competição dos peptídeos A2 e A10 com seus fagos correspondentes pela ligação à GST-E6.**



Inibição relativa da ligação do fago A2 à GST-E6 antes (100%) e após competição de 108 TU de fagos com diversas concentrações de peptídeo A2 (0,08 a 30 μM) (A) ou A10 (0,3 a 250 μM) (B) pela ligação à GST-E6 imobilizada em placa. A concentração final de DMSO no ensaio foi de 0,5. Análise da curva resposta por non-linear fit do log(inibidor) vs. resposta normalizada pelo controle apenas com DMSO com slope variável (software GraphPad Prism 8).

Além disso, as sequências de A2 e A10 são capazes de promover a competição cruzada entre fago e peptídeo sintético, indicando que ambos compartilham o mesmo sítio de ligação na proteína E6 (Figura 18).

**Figura 18 – Competição cruzada entre os fagos A2 e A10 e os peptídeos pela ligação à GST-E6.**

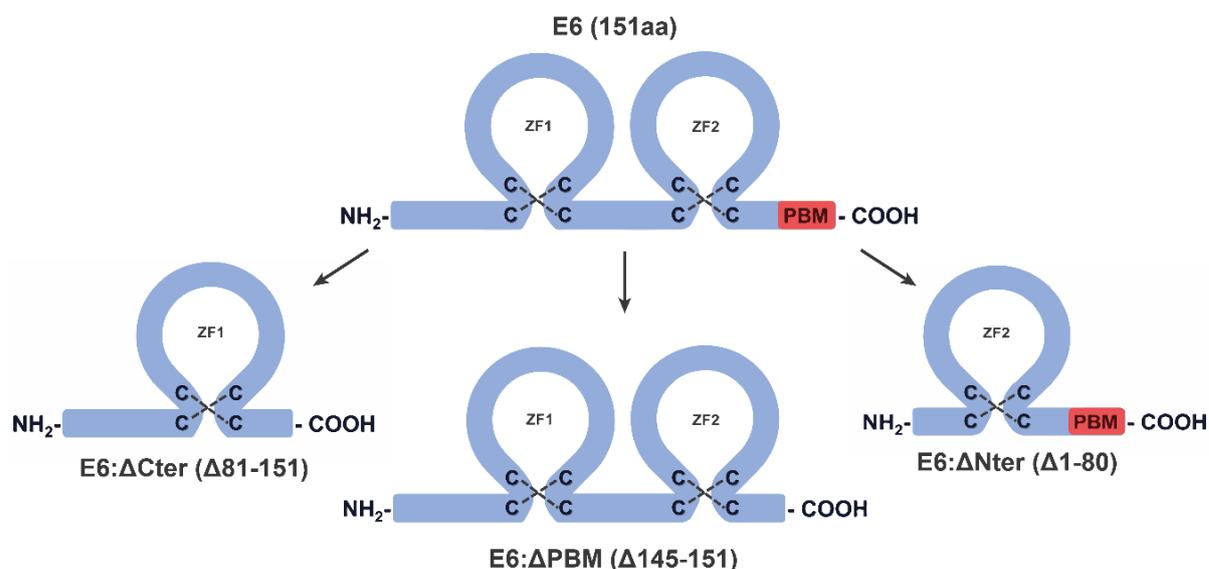


Ensaio de ligação de fagos A2 (**A**) e A10 (**B**) na presença ou ausência dos peptídeos A10 e A2, respectivamente. A concentração final de DMSO no ensaio foi de 1,5%. Resultado de três experimentos com resultados similares. Valores representados pela média  $\pm$  erro padrão da média. Teste *t* de *student*, \*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.5 Identificação do sítio de ligação dos fagos A2 e A10 na oncoproteína E6

A oncoproteína E6 é constituída de dois domínios do tipo dedo-de-zinco e um PBM. Para mapear qual(ais) destes domínios compõe(m) o sítio de ligação dos fagos identificados, nós produzimos proteínas mutantes com deleção da porção E6 nos domínios N-terminal (resíduos 1 a 80), C-terminal (resíduos 81 a 151), ou apenas do PBM (resíduos 145 a 151), o motivo de ligação a domínios PDZ, este último responsável por importantes interações proteicas realizadas pelas E6 de HPV de alto risco oncogênico (THOMAS et al., 2016) (Figura 19).

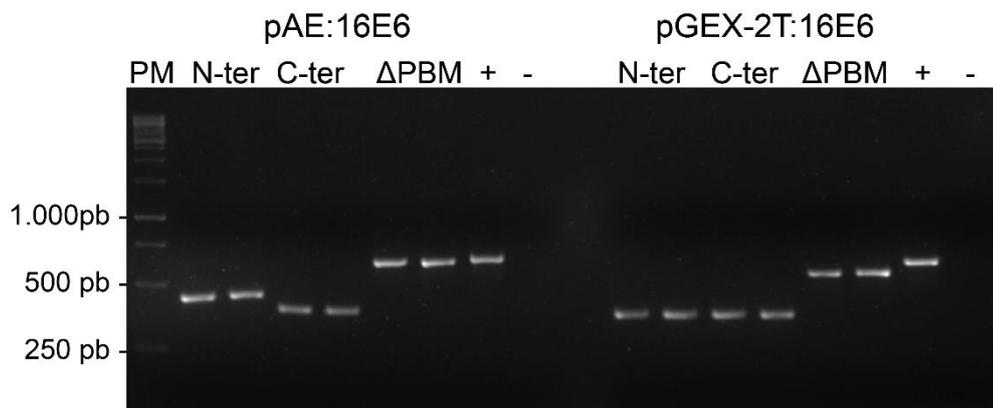
**Figura 19 – Deleções dos domínios da proteína E6.**



Desenho esquemático da estrutura da proteína E6 (superior) e das deleções produzidas, da esquerda para a direita: C-terminal ( $\Delta$  81-151), motivo PBM ( $\Delta$  145-151) e N-terminal ( $\Delta$  1-80).

As deleções foram realizadas nos vetores pAE:16E6, para produção dos fragmentos de E6 em fusão com cauda de histidina, ou pGEX-2T:16E6, para fusão à GST (Figura 20). À mesma maneira que a proteína original, foi possível obter proteína em fração solúvel para todas as expressões em fusão com GST mas não para E6 apenas (Figura 21 A e B). Houve produção de uma pequena fração solúvel para E6 com deleção C-terminal, que ao ser purificada não se mostrou suficientemente estável para a realização dos ensaios (Figura 21 C). Assim, os fragmentos de E6 fusionados à GST foram expressos e purificados por cromatografia de afinidade (Figura 21 D) para serem utilizadas em ensaios de ligação com os fagos.

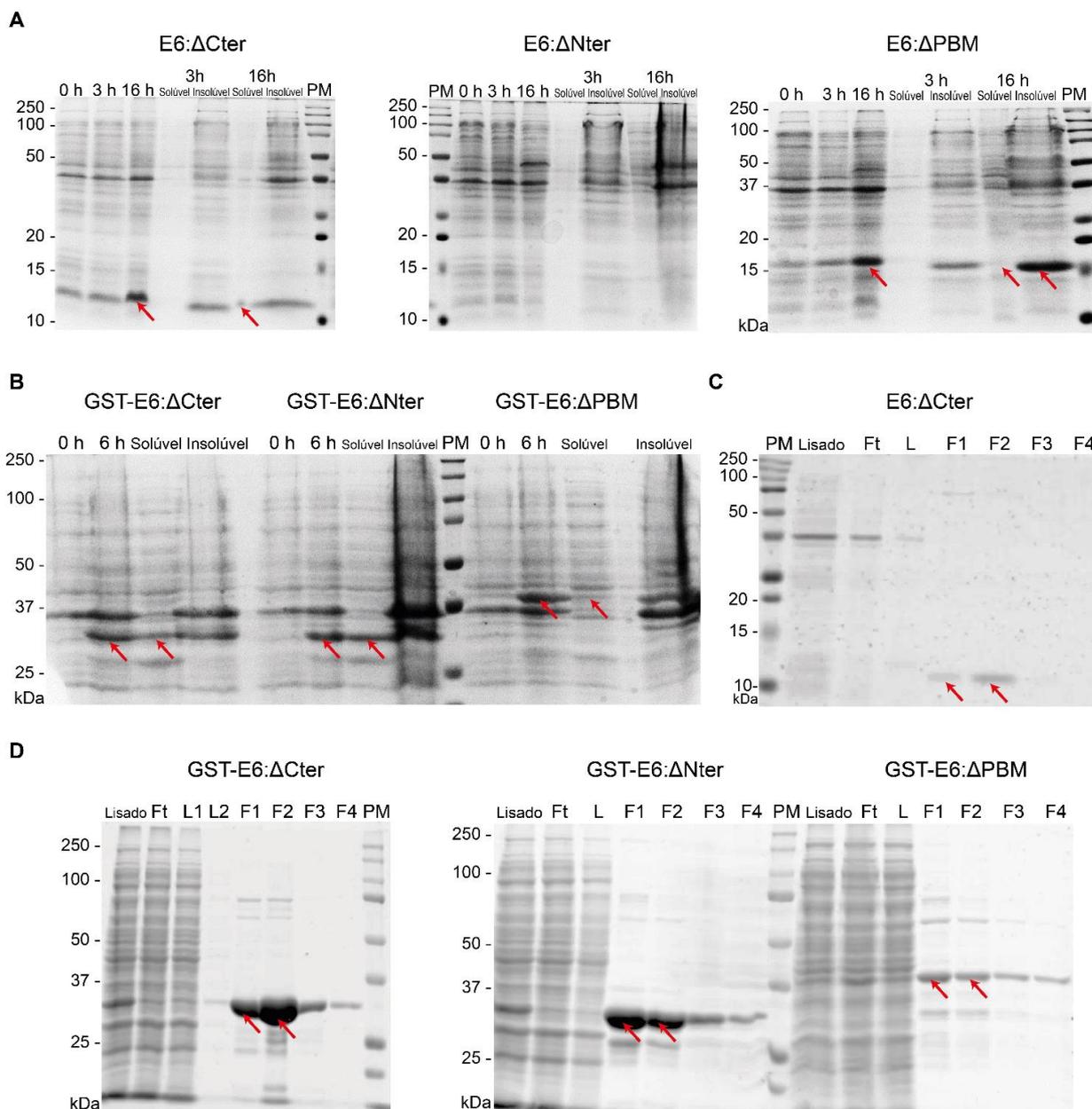
**Figura 20 – Deleção da sequência gênica dos domínios de E6.**



A sequência gênica dos domínios de E6 N-terminal, C-terminal e do motivo PBM foram deletados dos vetores pAE:16E6 e pGEX-2T:16E6, confirmados por PCR seguido de eletroforese em gel de agarose 1%. Como controle positivo, foi utilizado o vetor completo (+).

Nos ensaios de ligação de fagos às proteínas imobilizadas em placa, as deleções do N-terminal de E6 promoveram redução de 40% na ligação dos fagos que expressam A2 e 53,6% para os fagos que expressam o peptídeo A10, enquanto as deleções do C-terminal promoveram redução de 36% e 25% para A2 e A10, respectivamente. As deleções do PBM não afetaram a ligação dos fagos à GST-E6 (Figura 22). Estes resultados indicam que o domínio PBM não é necessário para ligação dos peptídeos apresentados pelos fagos identificados; ao mesmo tempo, sugere que ambos os domínios *zinc-finger* participam da ligação, embora nenhum deles seja essencial, sozinho, para a ligação dos peptídeos.

**Figura 21 – Expressão e Purificação dos domínios de E6.**



**A.** Expressão e solubilidade das proteínas E6 com deleção dos domínios N-terminal, C-terminal e do motivo PBM antes (0 h), 3 h e 16 h após a indução com 0,5 mM IPTG, cultivadas a 22 °C, 200 rpm. **B.** Expressão e solubilidade das proteínas GST-E6 com deleção dos domínios N-terminal, C-terminal e do motivo PBM antes (0 h), e 6 h após a indução com 0,5 mM IPTG, cultivadas a 30°C, 200 rpm. **C.** Purificação da proteína E6 com deleção do domínio C-terminal em sua forma solúvel por cromatografia de afinidade em coluna de Ni<sup>2+</sup>. **D.** Purificação das proteínas GST-E6 com deleção dos domínios C-terminal, N-terminal e do motivo PBM em sua forma solúvel por cromatografia de afinidade em coluna de Ni<sup>2+</sup>. As setas vermelhas indicam bandas com o tamanho esperado para cada proteína expressa e purificada. SDS-PAGE em gel de poliácridamida 12% (**B e D**) ou 15 % (**A e C**). Ft = *flow-through* da coluna de cromatografia, L, L1, L2 = lavagens, F = frações eluídas. PM = marcador de peso molecular.

Figura 22 – Ensaio de ligação dos fagos A2 e A10 à GST-E6 com deleções.

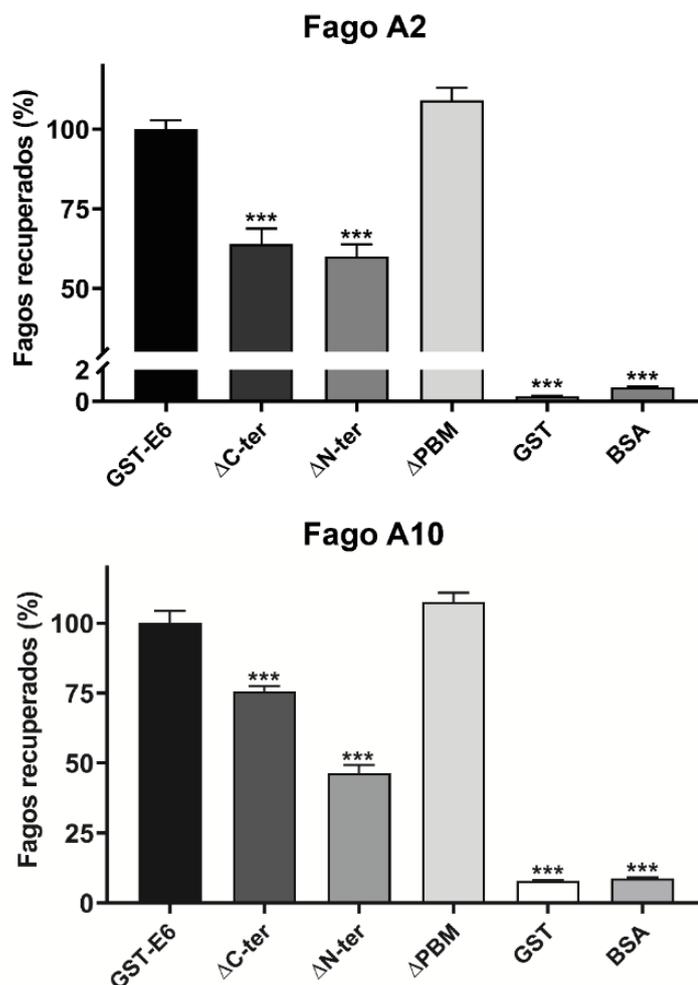


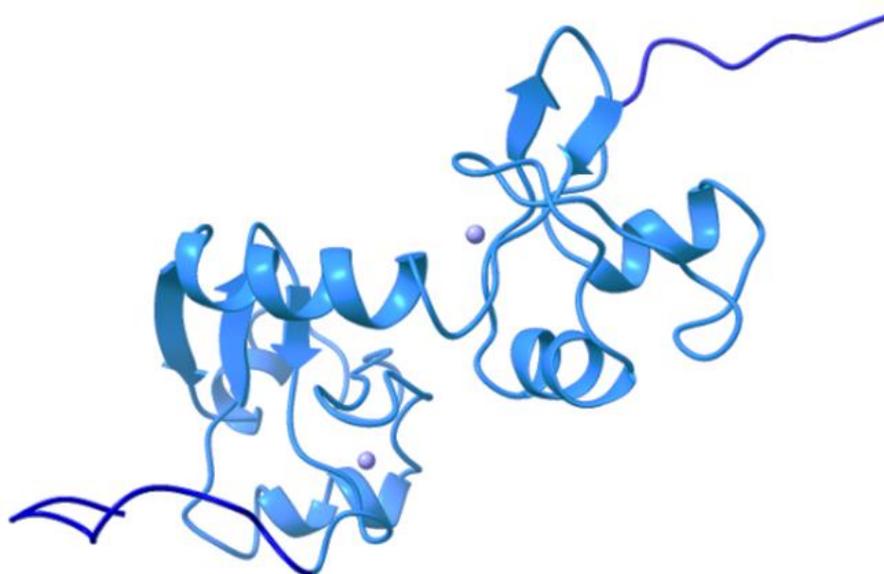
Gráfico representativo dos ensaios de ligação de fagos expressando os peptídeos A2 ou A10 às proteínas GST-E6 com deleção dos domínios N-terminal, C-terminal e do motivo PBM de E6. Os fragmentos de GST-E6 purificados foram quantificados, imobilizados em placa de 96 poços na concentração de 100nM e incubados individualmente com os  $10^7$  TU de fagos expressando os peptídeos A2 ou A10 ou com o fago controle (Fd). Após extensas lavagens, os fagos restantes foram recuperados por infecção bacteriana e a contagem de colônias foi utilizada para inferência do número de unidades transdutoras (TU). O fago Fd não se ligou à GST-E6N, GST-E6C ou GST-E6ΔPBM (dados não mostrados). Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. *One-way ANOVA* com *post test* de Tukey. \* $p < 0,0001$ .

#### 4.6 Análise *in silico* dos peptídeos A2 e A10 e sua ligação à E6: modelagem computacional e simulação de dinâmica molecular

Para obter mais informações com relação aos requerimentos estruturais da interação dos peptídeos identificados com a oncoproteína E6, partimos para estudos de modelagem, *docking* e dinâmica molecular. A proteína E6 foi modelada por homologia para obtenção da E6 completa, uma vez que as estruturas disponíveis no

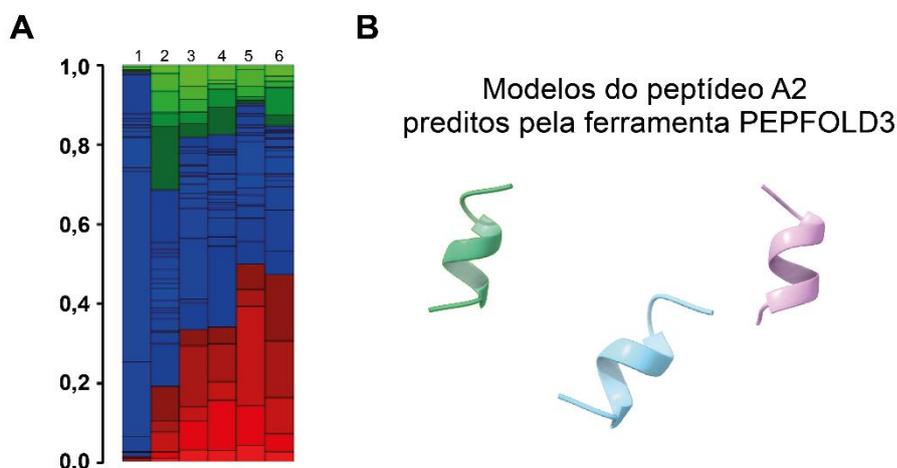
PDB (6SJA e 4XR8) não contemplam alguns resíduos N-terminais e o motivo PBM. Foram gerados 10 modelos, avaliados estereoquimicamente para a escolha do mais adequado para minimização e análises posteriores (Figura 23). Para análise inicial dos peptídeos, por sua vez, foram gerados cinco modelos de conformações iniciais para cada. Enquanto o peptídeo A2 foi predito como uma alfa-hélice (Figura 24), o A10 foi predito majoritariamente como estruturas espirais secundárias pouco definidas, embora apresentasse algumas regiões helicoidais (Figura 25). Esse resultado não é completamente inesperado, uma vez que o A10 apresenta 22 resíduos, sendo mais longo que o hexapeptídeo A2. Assim, optou-se por prosseguir apenas com o peptídeo A2, mais curto, cuja estrutura se apresentou mais bem-definida.

**Figura 23 – Modelo da proteína E6 com N e C-terminais completos.**



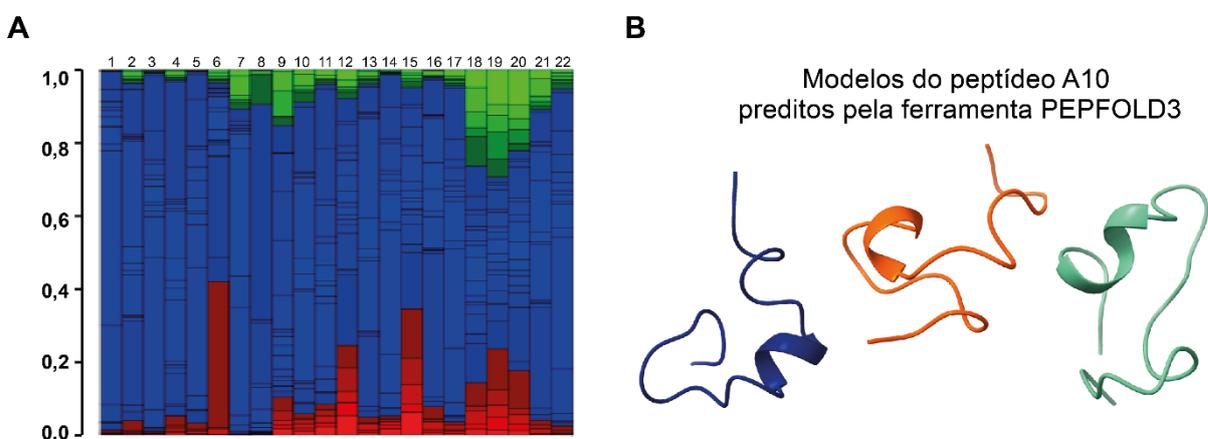
Modelo da proteína E6 gerado por homologia na ferramenta *Modeller* para incluir resíduos N-terminais não resolvidos pelas estruturas e o motivo de interação com domínios PDZ (PBM). Em azul claro, a estrutura da proteína E6 utilizada como ponto de partida (proveniente da estrutura cristalográfica 6SJA, PDB). Em azul escuro, as regiões adicionadas pelo modelo por homologia. Pontos brancos: átomos de  $Zn^{2+}$  requeridos para a organização dos *zinc fingers* e, conseqüentemente, da estrutura secundária da E6. Figura gerada pelo programa *ChimeraX* (PETTERSEN et al., 2021).

Figura 24 – Análise e modelos estruturais do peptídeo A2 gerados pela ferramenta *PEP-FOLD3*.



A. O gráfico representa a probabilidade (0 a 1) de cada resíduo do peptídeo, representados pelas colunas, assumirem um enovelamento helicoidal (vermelho), espiral (azul) ou estendido (verde). B. Três dos melhores modelos de enovelamento do peptídeo A2.

Figura 25 – Análise e modelos estruturais do peptídeo A10 gerados pela ferramenta *PEP-FOLD3*.



A. O gráfico representa a probabilidade (0 a 1) de cada resíduo do peptídeo, representados pelas colunas, assumirem um enovelamento helicoidal (vermelho), espiral (azul) ou estendido (verde). B. Três dos melhores modelos de enovelamento do peptídeo A10.

O modelo mais central para o peptídeo A2, a saber, o de menor RMSD (desvio quadrático médio entre as posições dos átomos, do inglês *Root-mean-square deviation of atomic positions*), foi utilizado como ponto de partida para a simulação de dinâmica molecular do peptídeo. A partir desta, o *frame* mais próximo da estrutura média oriundo da simulação foi utilizado para *docking* molecular no bolso de ligação

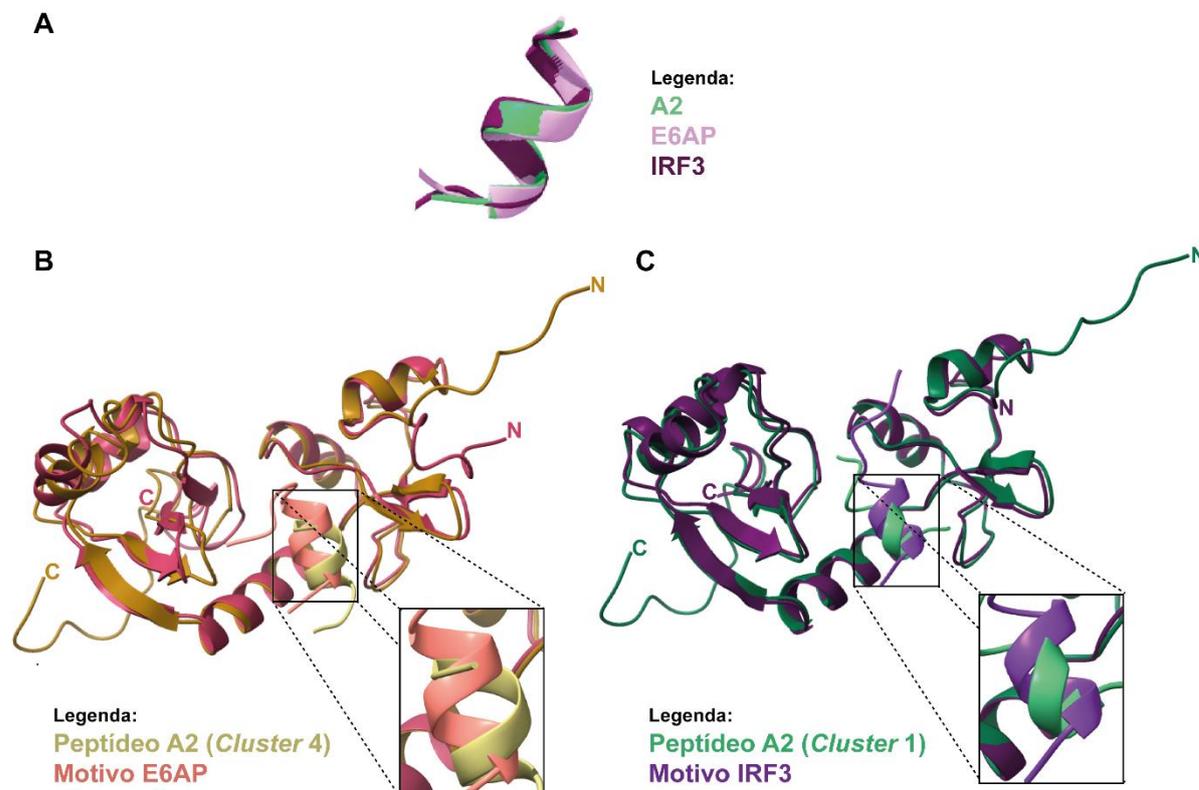
da proteína E6. Este bolso foi descrito como o sítio de acomodação da sequência consenso de algumas das proteínas ligantes de E6, como E6AP e a IRF3, denominado de motivo *LxxLL*, onde *xx* representa resíduos ácidos (ZANIER et al., 2013). As posições de interação do peptídeo A2 com a E6 obtidas no *docking* foram separadas em *clusters* (Tabela 3).

O peptídeo A2 demonstrou capacidade de acomodar-se e interagir com o bolso de ligação previamente descrito para ligantes de E6. Quando alinhado por estrutura secundária, o peptídeo A2 sobrepõe-se aos domínios *LxxLL* dos ligantes E6AP e IRF3 (Figura 26 A), além de apresentar características físico-químicas semelhantes que o permitem ocupar o mesmo bolso de ligação destes motivos na proteína E6, com poucas alterações apenas para acomodar as cadeias laterais dos resíduos do peptídeo A2 (Figura 26 B e C). Estes resultados, de certa forma, são uma validação *in silico* de nossos dados.

**Tabela 3 – Descrição dos clusters provenientes do *docking* molecular do peptídeo A2 no bolso de ligação *LxxLL* da oncoproteína E6.** Tamanho (número de posições) e *Haddock Score* médio para cada *cluster* gerado pelas análises de *docking* do peptídeo A2 em E6.

Número do Cluster	Haddock Score	Tamanho do Cluster
1	-93.4 ± -3.8	94
2	-97.6 ± -2.5	29
3	-91.4 ± -6.8	28
4	-86.2 ± -4.4	12
5	-80.0 ± -3.1	9
6	-61.9 ± -10.9	5
7	-70.7 ± -9.8	4

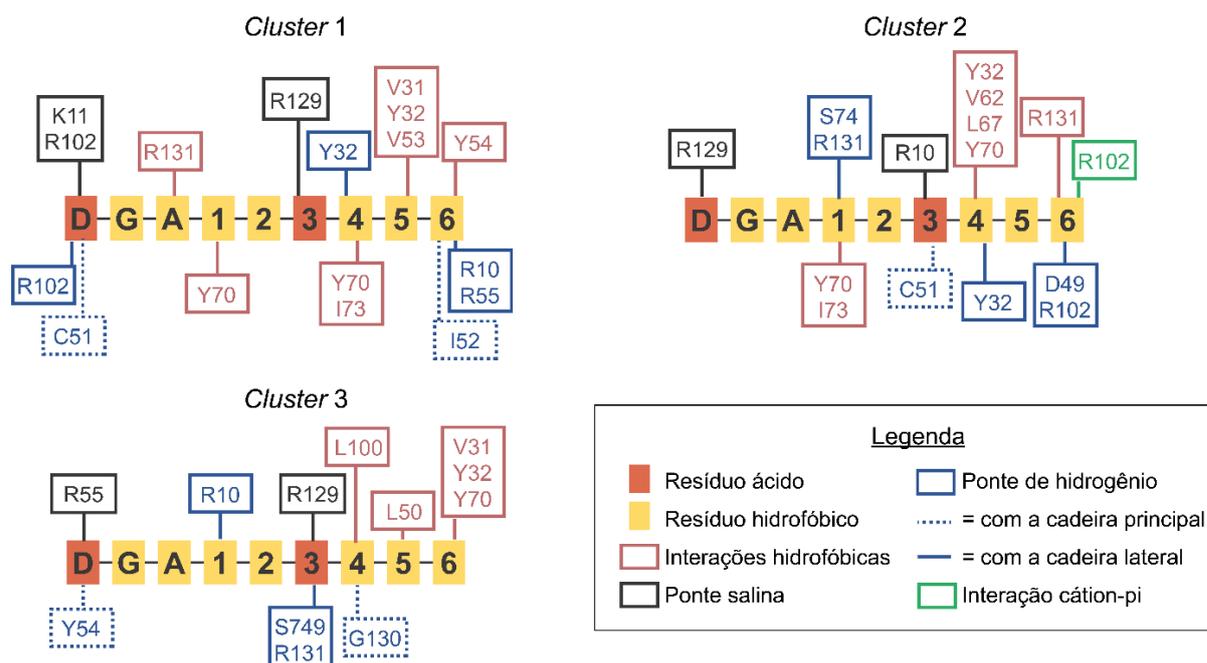
**Figura 26 – Comparação entre as estruturas de ligantes de E6 descritas e os modelos gerados no *docking* molecular do peptídeo A2 na proteína E6.**



**A.** Alinhamento das estruturas secundárias de peptídeos dos motivos *LxxLL* das proteínas E6AP e IRF3 com a estrutura do PepA2. *Software:* *ChimeraX* (Pettersen et al., 2021). **B.** Estrutura da proteína E6 (4XR8 PDB; rosa escuro) ligada ao motivo *LxxLL* (rosa claro) da proteína E6AP sobreposta ao modelo representativo do *Cluster 4* (bege) de modelos gerados pelo programa *Haddock* como resultado do *docking* molecular. **C.** Estrutura da proteína E6 (6SJA PDB; roxo) ligada ao motivo *LxxLL* (magenta) da proteína E6AP sobreposta ao modelo representativo do *Cluster 1* (verde).

As interações do peptídeo A2 com a proteína E6 evidenciadas pelos três *clusters* mais populosos na análise do *docking* foram mapeadas e estão representadas na figura 27.

**Figura 27 – Interações dos resíduos do peptídeo A2 com a proteína E6.**



Mapeamento das interações dos resíduos de aminoácidos do peptídeo A2 com proteína E6 (quadros) previstas pelo *docking* molecular e posterior análise pela ferramenta PLIP.

A pose com o menor *Haddock Score* no *cluster 1*, ou seja, a melhor pose do *cluster* mais populoso, foi utilizada para as análises de interação com a proteína E6 por dinâmica molecular. Durante uma simulação para refinamento das poses, a estrutura escolhida passou por uma breve variação para estabilização inicial (aproximadamente 50 ns) e se manteve estável durante o restante da simulação (Figura 28 A), assim como a estrutura modelada para E6 por homologia (Figura 28 B). Embora o peptídeo A2 tenha permanecido majoritariamente em sua estrutura helicoidal no sítio de ligação da E6 (Figura 29), houve alterações na pose inicial utilizada para acomodar o ligante peptídico no bolso, particularmente para os átomos das cadeias laterais. Tais poses puderam ser agrupadas por similaridade em três grandes grupos: as primeiras poses correspondem às estruturas semelhantes à pose inicial, que foram estáveis por menos de 10 s (destaque pelo quadrado preto menor, figura 30). Então, foram observadas poses intermediárias por aproximadamente 20 s

(destaque pelo quadrado intermediário, figura 30), seguidas das poses mais estáveis, que se mantiveram até o final da simulação (270 ns, destaque maior, figura 30). Três recortes deste último grupo, em 50 ns, 175 ns e 300 ns, foram considerados para a análise detalhada das interações do peptídeo A2 com o a proteína E6.

**Figura 28 – Estabilidade geral da proteína E6 e do peptídeo A2 durante a simulação de dinâmica molecular.**

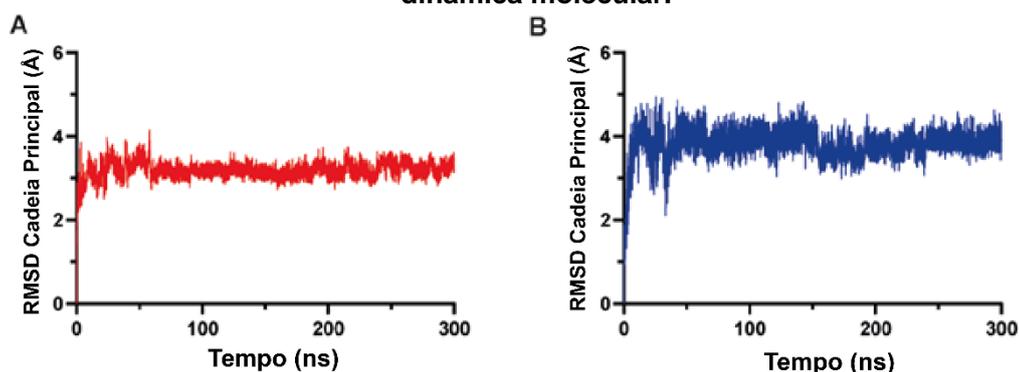


Gráfico representativo dos valores de RMSD dos átomos da cadeia principal em relação à estrutura inicial de E6 (A) e do peptídeo A2 (B) em função do tempo (ns).

**Figura 29 – Estrutura helicoidal do peptídeo A2 ao longo da simulação de dinâmica molecular.**

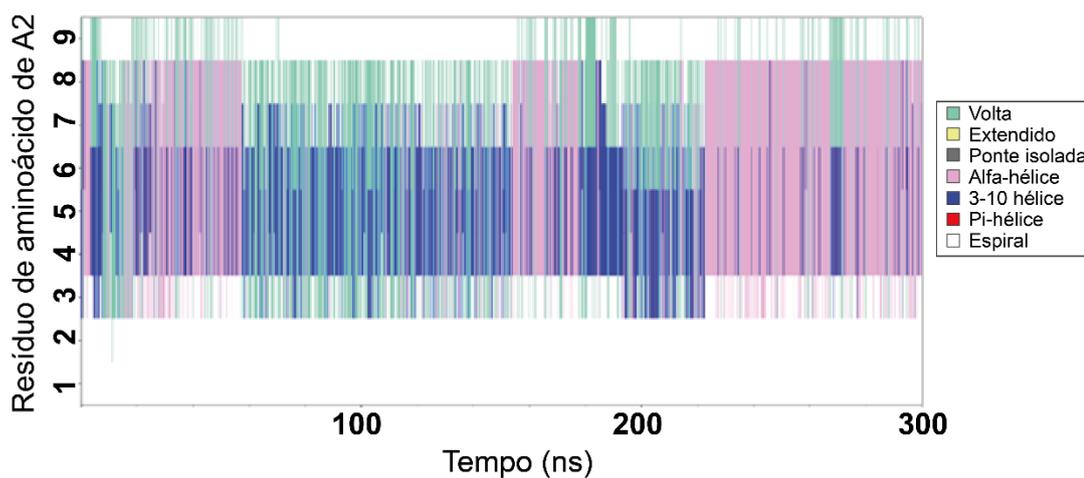


Gráfico representativo do cálculo das conformações de estrutura secundária de cada resíduo do peptídeo A2 (1 a 9) durante a simulação de dinâmica molecular.

**Figura 30 – Estabilidade das poses de ligação do peptídeo A2 durante a simulação de dinâmica molecular**

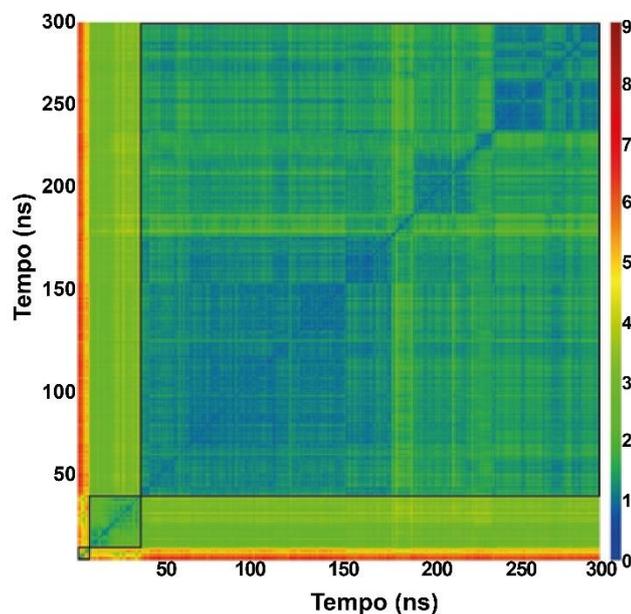


Gráfico representativo do cálculo na variação do RMSD 2D do peptídeo A2 durante a simulação de dinâmica molecular. O cálculo do RMSD foi feito considerando todos os átomos pesados dos resíduos peptídicos, após sobreposição de 5.000 momentos. Os quadrados pretos representam as três poses observadas durante a simulação, definidas pelo agrupamento das poses observadas utilizando como corte a distância de 3 Å.

Ao analisar três das poses mais estáveis do peptídeo A2 no bolso de ligação da proteína E6 durante a análise de dinâmica molecular, foi observado que A2 é capaz de formar pontes de hidrogênio com diversos resíduos de E6, bem como interações com moléculas de água presentes na simulação que mediam interações deste com a proteína. A região C-terminal do peptídeo também é capaz de formar pontes salinas com resíduos de arginina da E6, particularmente com os resíduos 77 e 129. Também foram encontradas diversas interações hidrofóbicas com os resíduos da cavidade. Interessantemente, observou-se interações *cation-pi* e *pi-stacking* entre A2 e E6, inéditas para as ligações de aminoácidos já descritas nesta região da proteína E6 (Tabela 4). Se por um lado, a identificação dos peptídeos A2 e A10 corroboram dados já descritos na literatura com relação ao sítio de interação da oncoproteína E6 a seus ligantes, os estudos de *docking* e dinâmica molecular revelam um novo modo de

interação entres estes pares ligantes. Este conhecimento poderá ser útil no desenho racional de novas moléculas inibidoras de E6 para o tratamento de doenças causadas pelo HPV.

**Tabela 4 – Principais interações entre resíduos de A2 e E6.** Descrição e estabilidade das interações entre resíduos de aminoácidos do peptídeo A2 e da proteína E6 encontradas na simulação de dinâmica molecular. A estabilidade da interação foi considerada baixa (<20%), média (20-40%) ou alta (> 40 %) de acordo com o tempo de permanência (ns) da interação em relação ao tempo total de simulação.

Interação	Resíduo da E6	Resíduo do A2	Estabilidade na simulação
Ponte de Hidrogênio	Arg129	6	Alta
	His78	7	Alta
	Arg10	1	Média
	Tyr32	7	Média
	Ser74	7	Média
	Arg129	9	Média
	Gln7	1	Baixa
	Cys51	1	Baixa
	Cys51	4	Baixa
Ponte Salina	Arg77	9	Alta
	Arg129	9	Alta
	Arg10	1	Média
<i>Cation-pi</i>	Arg129	9	Alta
	Arg131	7	Alta
<i>Pi-Stacking</i>	Tyr32	9	Baixa

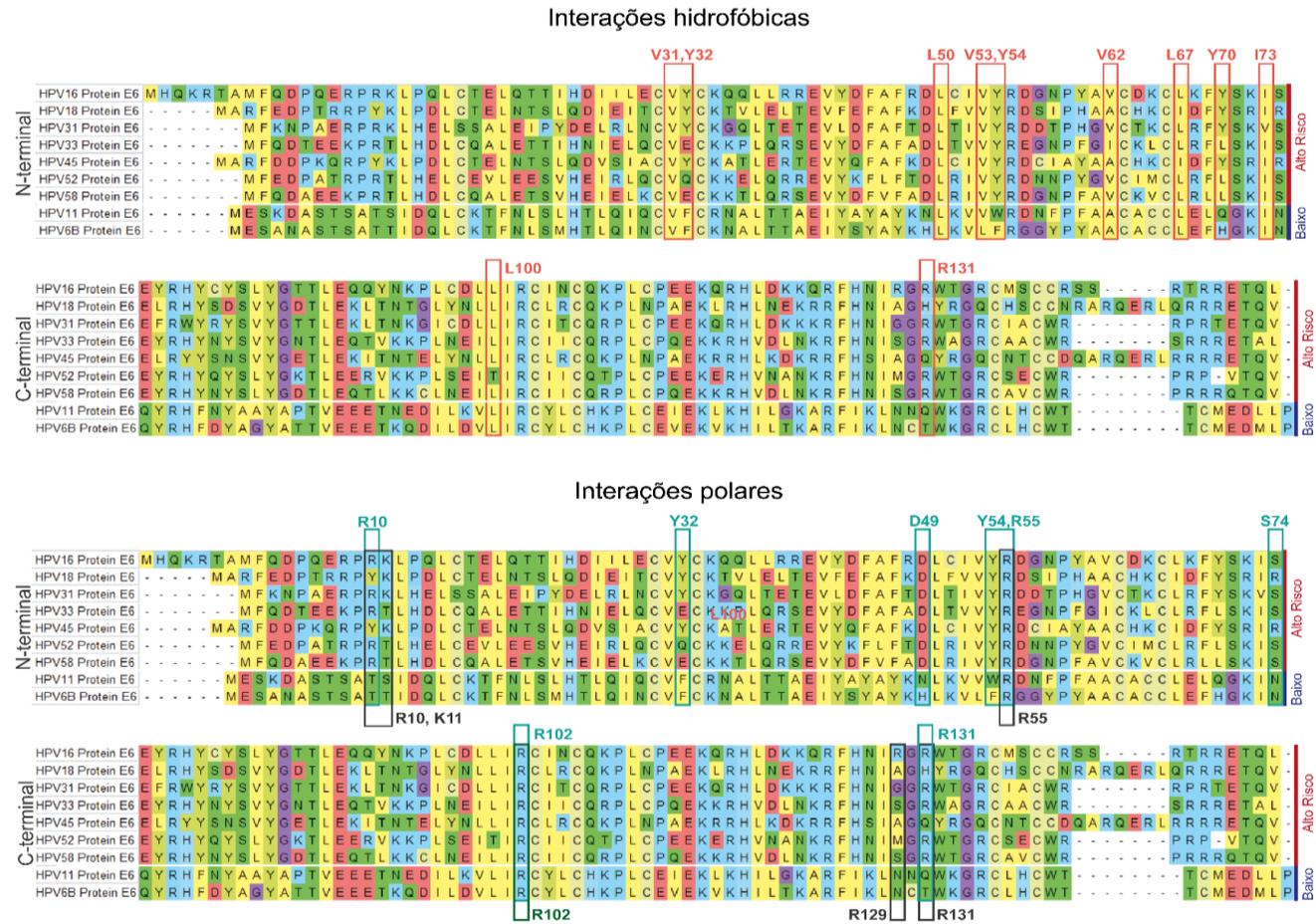
Comparando-se as interações entre A2 e E6 com as interações previamente descritas dos motivos *LxxLL* com esta proteína, à exceção das interações *pi*, há interações com E6 em comum entre A2 e todos os motivos, com maior concordância das interações com a sequência ELTLQELLGEER, encontrada na proteína E6AP (PDB 4GIZ e 4XR8; Tabela 5).

**Tabela 5 – Comparação das interações entre E6 e o peptídeo A2 com as interações entre E6 e outros peptídeos com o motivo LxxLL.** Estabilidade das interações estabelecidas pelo peptídeo A2 durante a simulação de dinâmica molecular (ausente, baixa, média ou alta) em comparação à presença (+) ou ausência (-) das mesmas interações em estruturas previamente descritas de E6 interagindo com ligantes LxxLL (PDB 6SJA, LDELL de IRF3; 4GIZ, 4XR8: LQELL de E6AP).

Interação	Resíduo de E6	A2 (Simulação)	EDILDELLGNMV (PDB 6SJA)	ELTLQELLGEER (PDB 4GIZ)	ELTLQELLGEER (PDB 4XR8)
Pontes de hidrogênio	Gln7	Baixa	-	-	-
	Arg10	Média	-	-	+
	Tyr32	Média	-	-	-
	Cys51	Baixa	+	+	+
	Arg55	Baixa	-	+	+
	Ser74	Média	-	-	-
	His78	Alta	-	-	+
	Arg102	Baixa	+	-	+
	Arg129	Alta	+	+	-
	Arg131	Baixa	-	+	-
Ponte Salina	Arg10	Média	+	+	-
	Lys11	Baixa	-	+	-
	Arg55	Ausente	-	+	+
	Arg77	Alta	-	-	-
	Arg129	Alta	+	-	+
Cation- $\pi$	Arg129	Alta	-	-	-
	Arg131	Alta	-	-	-
$\pi$ -Stacking	Tyr32	Baixa	-	-	-

Por fim, ao comparar os resíduos de aminoácido da proteína E6 de HPV16 que interagiram com o peptídeo A2 no *docking* molecular com os resíduos presentes na E6 de outros tipos virais, nota-se que são conservados entre os HPV de alto risco oncogênico (18, 31, 33, 45, 52, 58), mas não entre os tipos 6 e 11, de baixo risco oncogênico (Figura 31). A maior diferença de sequência entre os tipos de alto risco foi de 13,6% (3 resíduos diferentes em 22 resíduos) para os HPVs 45 e 52, enquanto os de baixo risco, representados pelos tipos virais 6 e 11 (últimas linhas), apresentaram quase três vezes mais resíduos diferentes, com 8 divergências em 22 aminoácidos (36,3%).

**Figura 31 – Resíduos da proteína E6 preditos nas interações com o peptídeo A2 conservados entre os HPV de alto risco oncogênico, mas não entre os de baixo risco.**

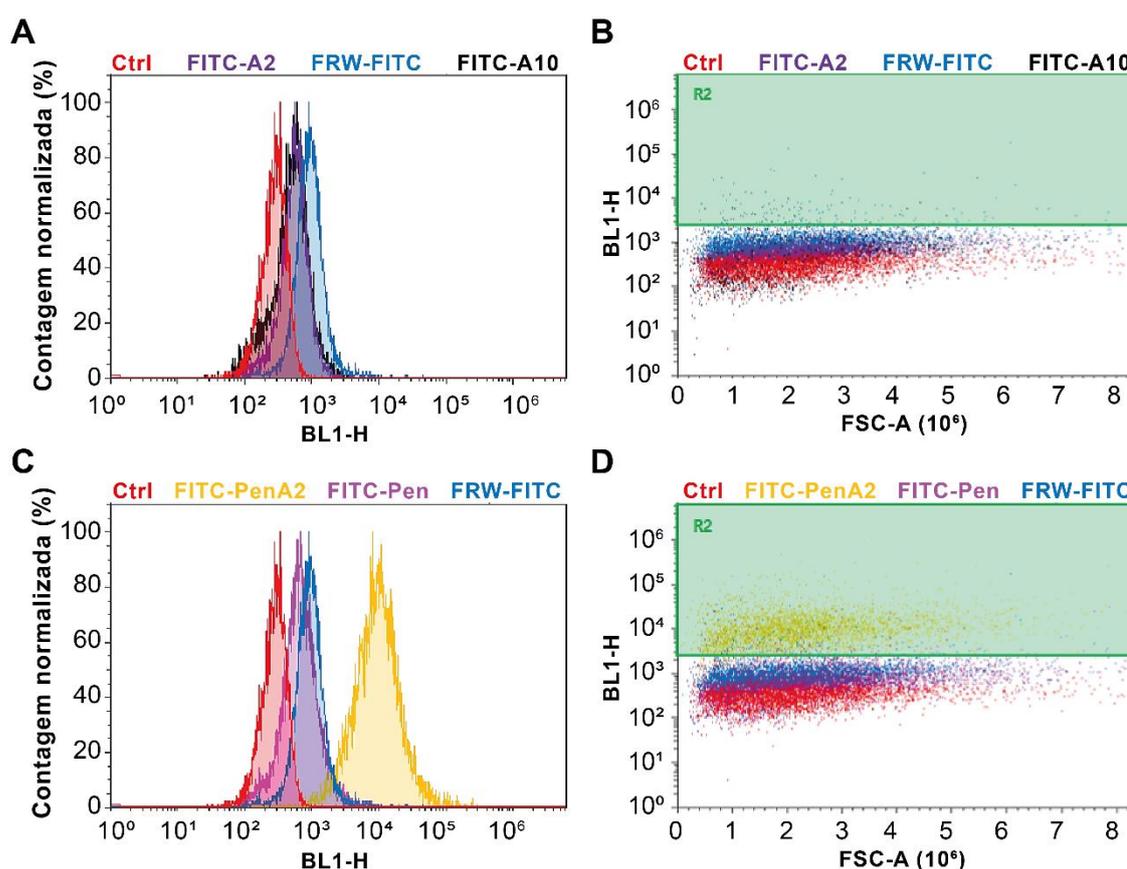


Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas E6 dos HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 disponíveis do banco *Uniprot* com destaque para resíduos com possíveis interações hidrofóbicas (A) ou polares (B) com o peptídeo A2. Software *MEGA-X*, alinhamento *ClustalW*, configurações-padrão. Os quadros laranja destacam as interações hidrofóbicas, enquanto as polares estão divididas em pontes de hidrogênio (em azul; linha contínuas para interações com a cadeia lateral e linhas tracejadas para interação com a cadeira principal), pontes salinas (cinza) e interações *cátion-pi* (verde).

#### 4.7 Análise funcional dos peptídeos A2 e A10 em linhagens celulares

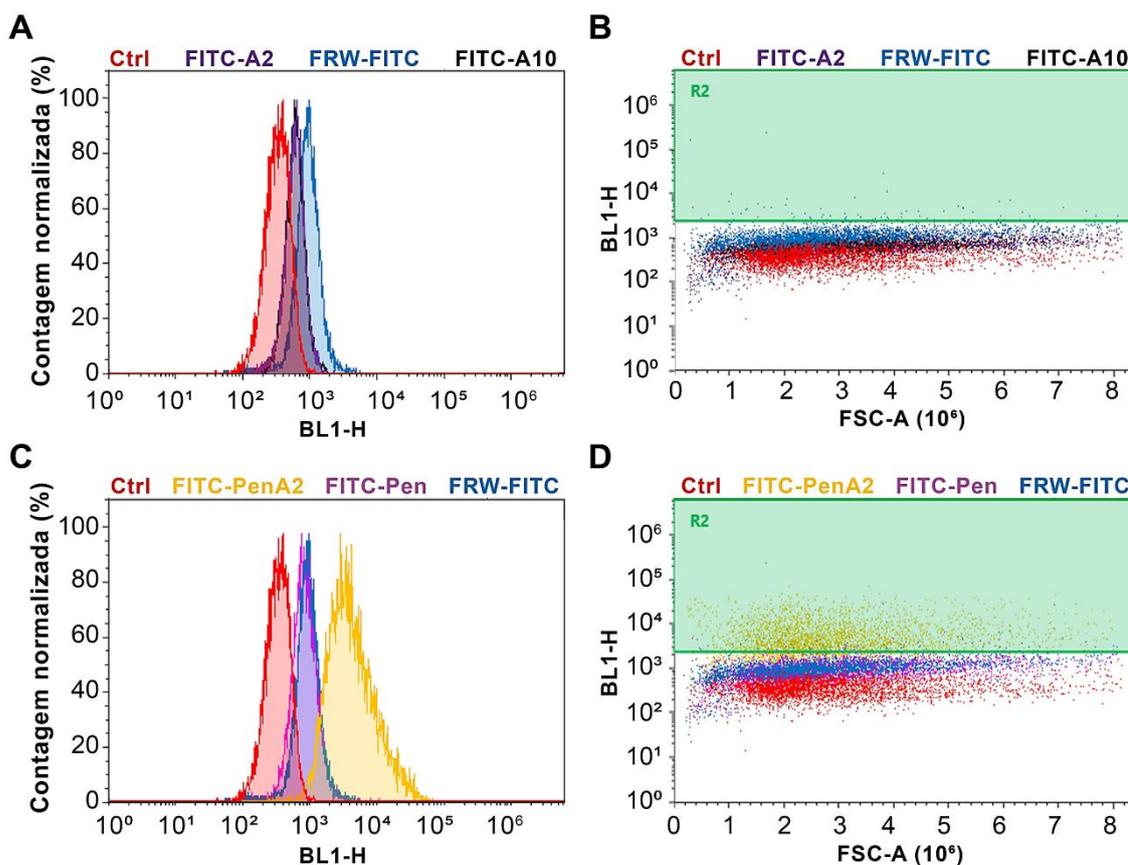
O primeiro parâmetro analisado foi a capacidade de internalização espontânea dos peptídeos nas linhagens SiHa (HPV16-positiva) e C33a (HPV-negativa). Apenas o peptídeo A2 fusionado à penetratina (FITC-PenA2), um peptídeo de penetração celular, atravessou espontaneamente a membrana celular. Os peptídeos FITC-A2, FITC-A10 e o controle FITC-FRW demonstraram baixa capacidade de internalização (Figura 32 e 33).

Figura 32 – Internalização dos peptídeos na linhagem celular C33a.



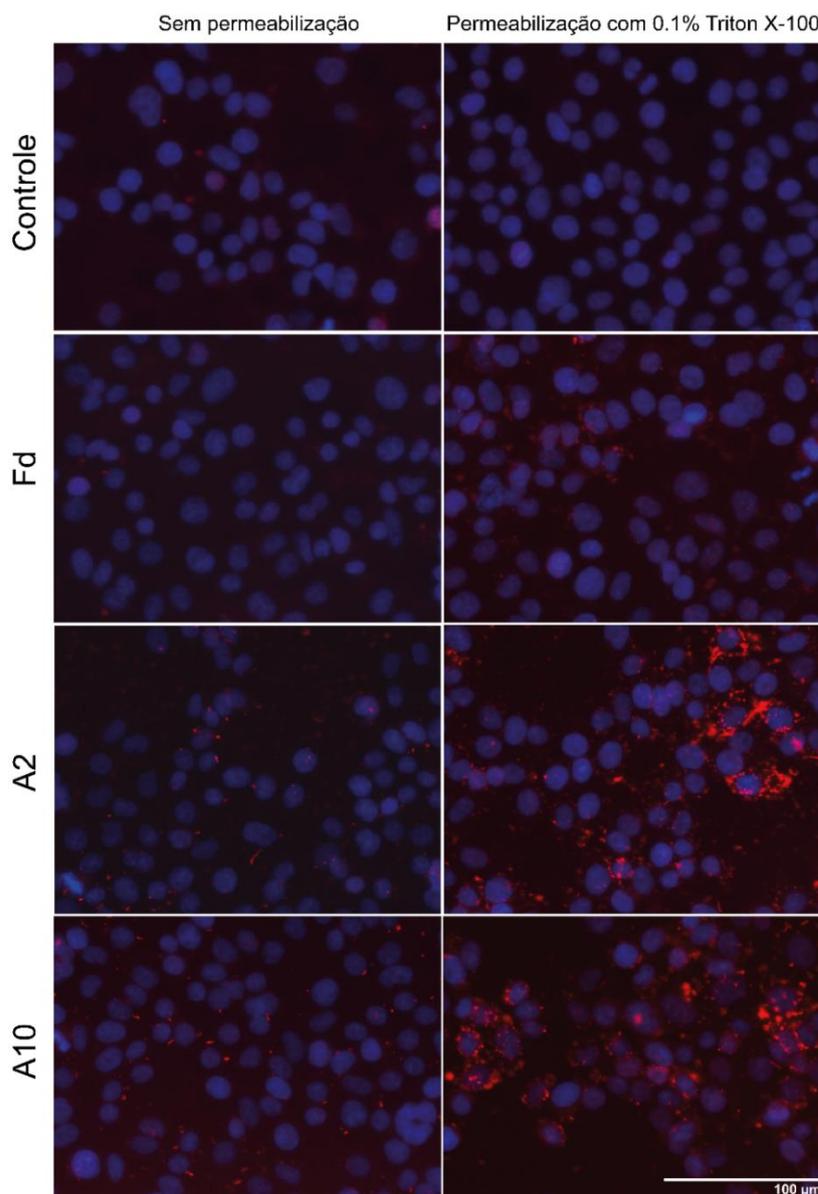
As células foram tratadas com  $10\mu\text{M}$  de peptídeo por 1h, incubadas com tripsina para remover peptídeos aderidos ao exterior da célula e ressuspensas em PBS para análise por citometria de fluxo. **A, C.** Histogramas representativos de contagem de células (% do total de eventos) por intensidade de fluorescência de FITC do controle (sem peptídeo; em vermelho) e dos tratamentos por FITC-A2 (roxo), FITC-A10 (preto) e FRW-FITC (azul), FITC-Pen (rosa) e FITC-Pen-A2 (amarelo) para a linhagem C33a. **B, D.** O *gate* adicional R2 foi estabelecido no canal BL1-H, com destaque para a grande população de células incubadas com FITC-Pen-A2 positivas para FITC. Os experimentos foram realizados em triplicatas e replicatas representativas foram utilizadas para construção dos histogramas.

Figura 33 – Internalização dos peptídeos na linhagem celular SiHa.

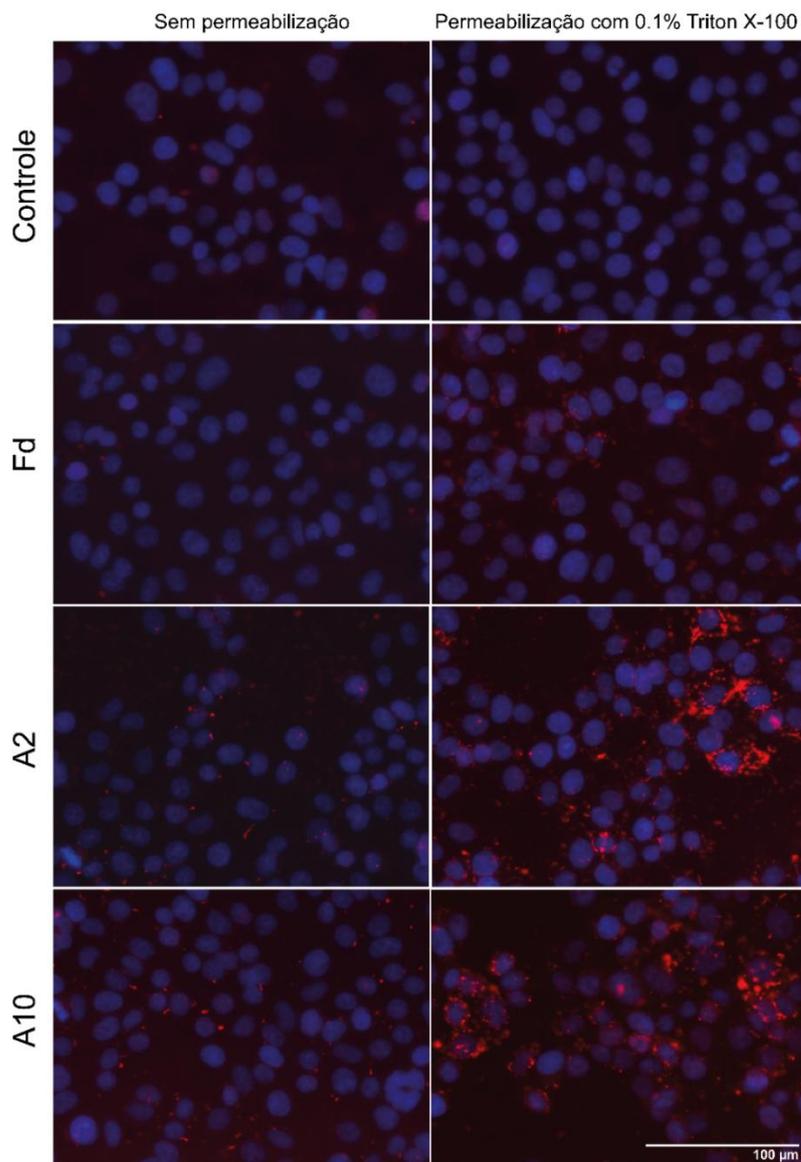


As células foram tratadas com 10 $\mu$ M de peptídeo por 1h, incubadas com tripsina para remover peptídeos aderidos ao exterior da célula e ressuspensas em PBS para análise por citometria de fluxo. **A, C.** Histogramas representativos de contagem de células (% do total de eventos) por intensidade de fluorescência de FITC do controle (sem peptídeo; em vermelho) e dos tratamentos por FITC-A2 (roxo), FITC-A10 (preto) e FRW-FITC (azul), FITC-Pen (rosa) e FITC-Pen-A2 (amarelo) para a linhagem SiHa. **B, D.** O *gate* adicional R2 foi estabelecido no canal BL1-H, com destaque para a grande população de células incubadas com FITC-Pen-A2 positivas para FITC. Os experimentos foram realizados em triplicatas e replicatas representativas foram utilizadas para construção dos histogramas.

A internalização dos fagos que expressam os peptídeos A2 e A10 foi adicionalmente avaliada por imunofluorescência nas mesmas linhagens celulares. Apresentados pelos fagos, foi observada alguma capacidade dos peptídeos de atravessar a membrana celular, mas a internalização não se mostrou homogênea (Figura 34 e 35).

**Figura 34 – Internalização de fagos na linhagem celular C33a.**

As células C33a foram plaqueadas em lâminas de 8 poços e incubadas por 24h com  $2 \times 10^9$  TU de fago selvagem (Fd), expressando a sequência A2 ou a A10. Foram lavadas, fixadas e permeabilizadas (direita) ou não (esquerda) para detecção dos fagos com anticorpo primário anti-fago e anticorpo secundário fluorescente (vermelho), com marcação dos núcleos por DAPI (azul). As lâminas foram analisadas em microscópio EVOS FLoyd. Aumento de 200X.

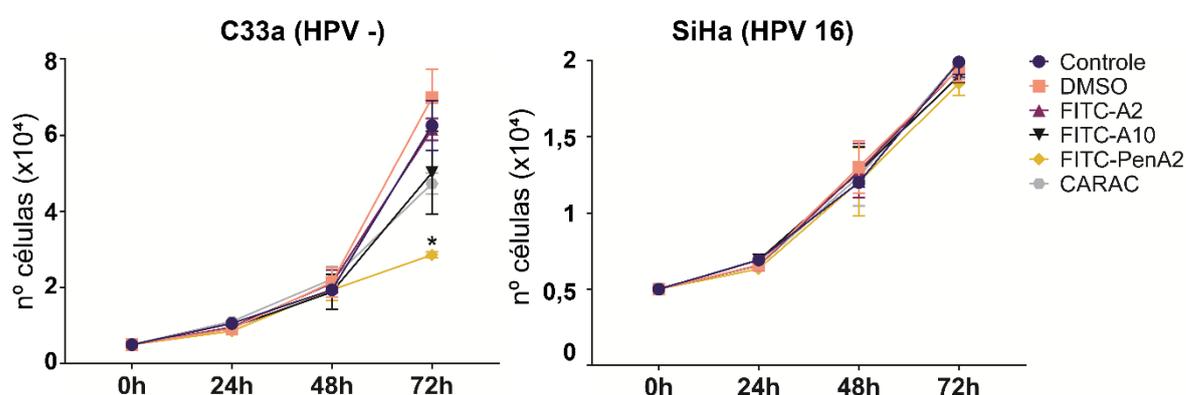
**Figura 35 – Internalização de fagos na linhagem celular SiHa.**

As células SiHa foram plaqueadas em lâminas de 8 poços e incubadas por 24h com  $2 \times 10^9$  TU de fago selvagem (Fd), expressando a sequência A2 ou a A10. Foram lavadas, e permeabilizadas (direita) ou não (esquerda) para detecção dos fagos com anticorpo primário anti-fago e anticorpo secundário fluorescente (vermelho), com marcação dos núcleos por DAPI (azul). As lâminas foram analisadas em microscópio EVOS FLoyd. Aumento de 200X.

Ainda assim, os peptídeos em sua forma sintética foram então administrados às células em cultura para avaliar se estes poderiam interferir na viabilidade celular das linhagens. Para tal, foi utilizado WST-1, um sal tetrazólico cuja conversão em formazan acontece via sistema succinato-tetrazólio redutase, parte da cadeia respiratória da mitocôndria. Este ensaio pode ser utilizado para inferência de

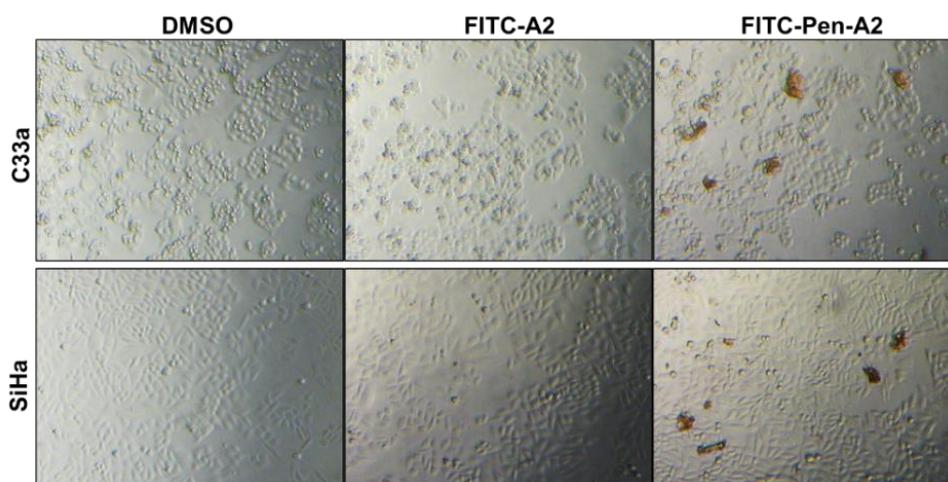
viabilidade celular, uma vez que esta via só permanece ativa em células viáveis. Observou-se redução da viabilidade apenas para as células C33a tratadas com o peptídeo FITC-PenA2 (Figura 36). Ao microscópio, verificou-se que o peptídeo forma agregados microscópicos que se depositam sobre as células em cultura (Figura 37).

**Figura 36 – Atividade metabólica de células tratadas com os peptídeos FITC-A2, FITC-Pen-A2 e FITC-A10.**



Células C33a ou SiHa foram incubadas com 10  $\mu$ M ou sem os peptídeos sintéticos (24 a 72 h) e a atividade metabólica foi determinada pelo método de WST-1. A medida da absorbância foi utilizada para inferência do número de células por poço relativo ao número de células iniciais (0 h). Todas as condições foram testadas em triplicata. Dados representados pela média  $\pm$  desvio padrão. *Two-way ANOVA* com *post-hoc test* de Dunnet. \* $p < 0,05$ .

**Figura 37 – Linhagens C33a e SiHa em cultura com administração de peptídeos.**

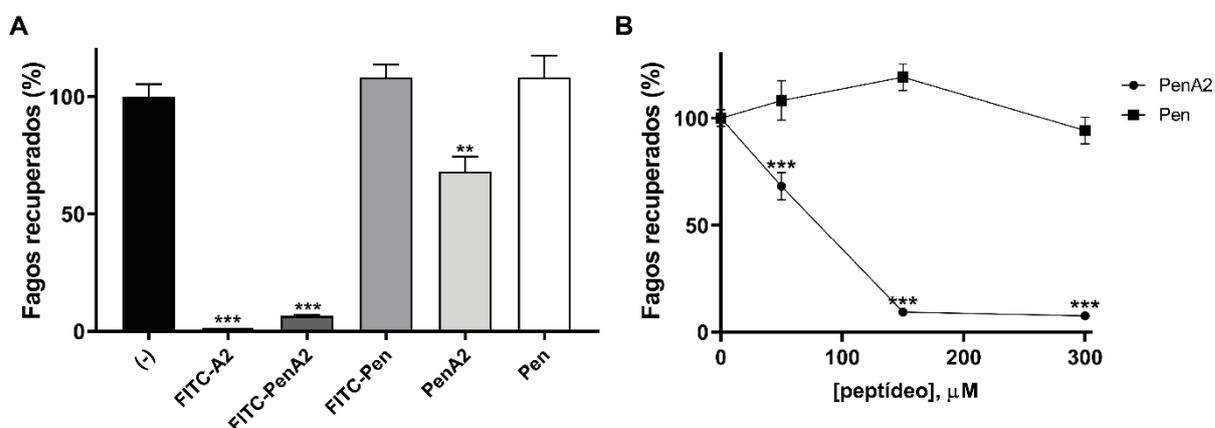


**A.** Micrografia dos poços de cultivo de células C33a (superior) e SiHa (inferior) com administração do veículo (DMSO) ou dos peptídeos FITC-A2 e FITC-Pen-A2, este último apresentando agregados de peptídeo insolúvel sobre as células. Aumento de 100 X.

Embora seja capaz de internalizar espontaneamente nas células (Figura 32 e 33), o peptídeo A2 fusionado à Penetratina (FITC-PenA2) demonstrou menor capacidade de competição com o fago correspondente quando comparado ao FITC-A2, além de baixa solubilidade em diversos tampões testados. Uma vez que a reduzida solubilidade e a toxicidade do peptídeo FITC-PenA2 em linhagens celulares pode se relacionar com a fusão ao FITC (PUCKET & BARTON, 2009), foi encomendado o peptídeo A2 em fusão à Penetratina sem marcação por FITC, denominado PenA2. Quando comparado com FITC-A2 e FITC-PenA2, PenA2 necessitou de concentrações maiores (150 e 300  $\mu\text{M}$ ) para inibir a ligação do fago A2 à GST-E6 imobilizada em placa (Figura 38), mas apresentou solubilidade muito superior.

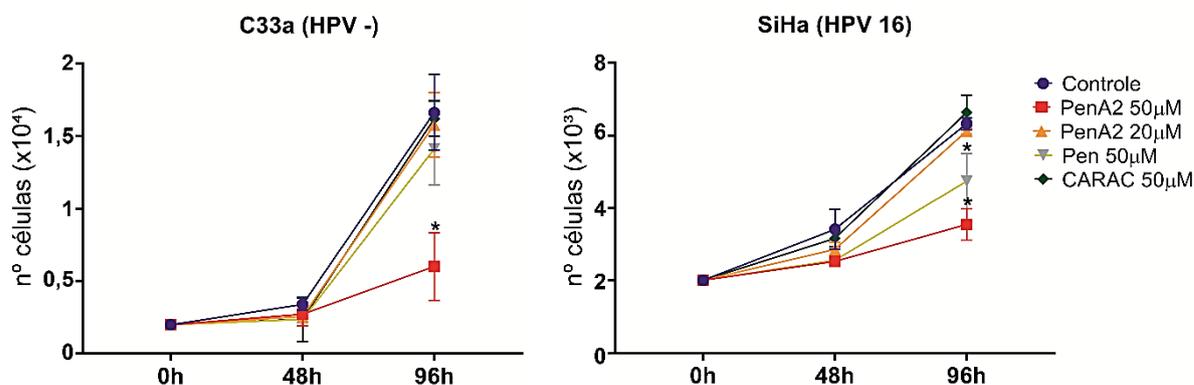
Porém, quando testado em diversas linhagens celulares, o peptídeo PenA2 não teve efeito consistente sobre a viabilidade de linhagens HPV16-positivas, como SiHa e SCC90, ou HPV-18 positivas, como a HeLa, apresentando apenas efeitos citotóxicos inespecíficos em linhagens HPV-negativas, como C33a e HEK293 (Figuras 39 e 40).

**Figura 38 – Competição do peptídeo A2 fusionado à penetratina com o fago A2 pela ligação à GST-E6.**



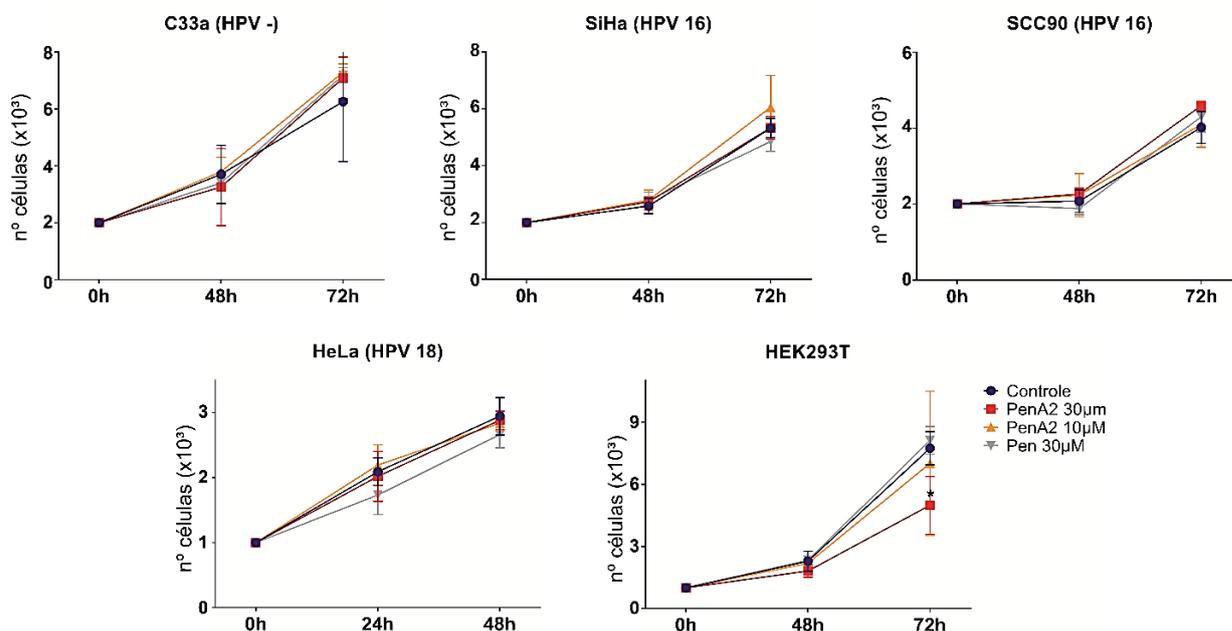
**A.** Ensaio de ligação de fagos à proteína E6-GST imobilizada na presença de 50 µM ou ausência dos peptídeos A2 e PenA2 marcados ou não com FITC. O número de unidades transdutoras de fagos recuperados foi normalizado em relação à média de TU recuperadas sem competição (-). A concentração final de DMSO no ensaio foi de 0,5 %. Valores representados pela média ± SEM. *One-way ANOVA* com pós-teste de *Dunnett*. \*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p = 0,001$ . **B.** Ensaio de ligação de fagos à proteína E6-GST imobilizada na presença dos peptídeos Pen e PenA2 marcados nas concentrações de 50, 100 e 300 µM. Valores representados pela média ± SEM. Resultado de três experimentos com resultados similares. *Two-way ANOVA* com pós-teste de *Sidak*, \*\*\* $p < 0,0001$ .

**Figura 39 – Atividade metabólica de linhagens celulares tratadas com o peptídeo PenA2.**



Células C33a ou SiHa foram incubadas com ou sem os peptídeos sintéticos (48 a 96 h) e a atividade metabólica foi determinada pelo método de WST-1. A medida da absorbância foi utilizada para inferência do número de células por poço relativo ao número de células iniciais (0 h). Todas as condições foram testadas em triplicata. Dados representados pela média ± desvio padrão. *Two-way ANOVA* com *post-hoc test* de *Dunnet*. \* $p < 0,05$ .

**Figura 40 – Atividade metabólica de linhagens celulares tratadas com o peptídeo PenA2.**



Células C33a, SiHa, SCC90, HeLa e HEK293T foram incubadas com ou sem os peptídeos sintéticos (24, 48, 72 h) e a atividade metabólica foi determinada pelo método de WST-1. A medida da absorbância foi utilizada para inferência do número de células por poço relativo ao número de células iniciais (0 h). Todas as condições foram testadas em triplicata. Dados representados pela média  $\pm$  desvio padrão. *Two-way* com *post-hoc test* Dunnett, \*  $p < 0.05$ .

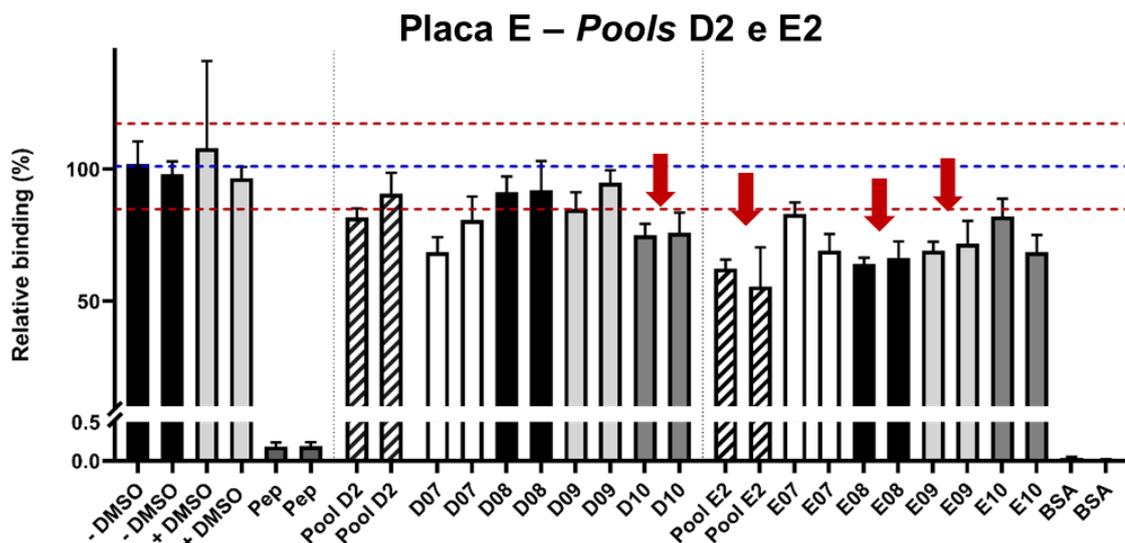
#### 4.8 Ligação fago-proteína como ferramenta: *varredura* do banco de compostos “*Pandemic Response Box*”.

A interação fago-proteína entre o peptídeo A2 e a proteína E6 mostrou-se altamente específica e foi utilizada como base para o delineamento de um ensaio de *displacement screening*. O racional para este experimento baseia-se no conceito de que se um composto mimetizar o peptídeo A2 ou A10, ele será capaz de competir pela ligação do respectivo fago à oncoproteína E6. Ou seja, este ensaio permite encontrar compostos ligantes da proteína E6 que, desta maneira, pudessem competir com o fago e deslocar sua ligação. Uma vez que o banco de compostos em questão recomenda a solubilização dos compostos em DMSO, foram inicialmente realizados ensaios de ligação de fagos na presença de diferentes concentrações de DMSO, para verificar a tolerância do ensaio de competição de fagos a este solvente. Assim,

determinou-se que as concentrações de 0,5%, 1% e 2% de DMSO seriam utilizadas no ensaio, com inibição máxima de 20% da ligação de fagos (dados não apresentados).

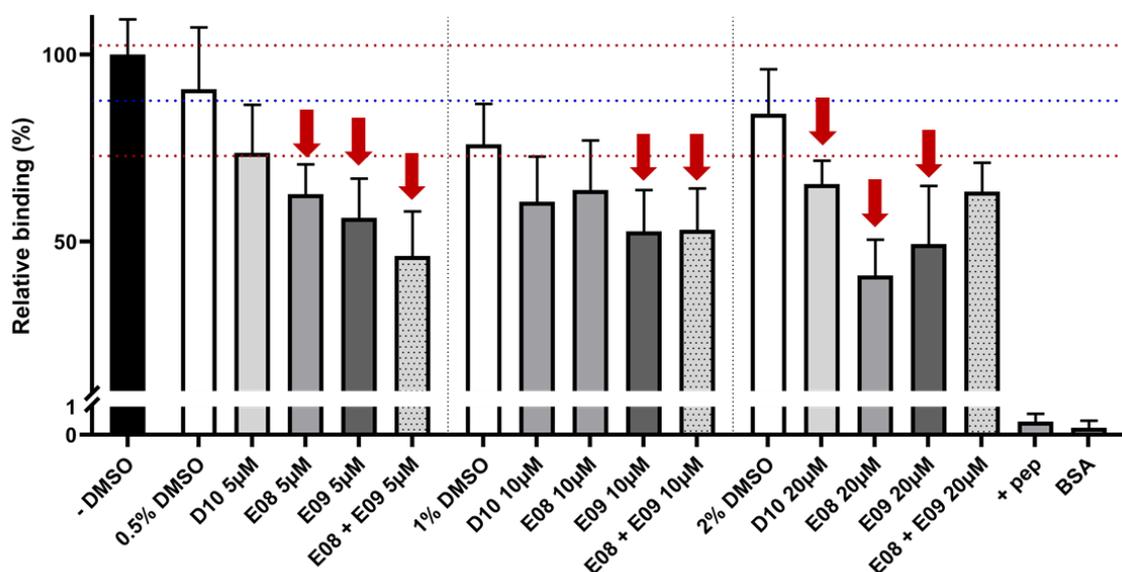
Os 400 compostos foram testados por sua capacidade de inibir a ligação de A2 à GST-E6 imobilizada em placa em combinações de cinco compostos a 10  $\mu$ M cada, à exceção de alguns compostos da placa E, testados individualmente (Figura 6). Destes, as combinações D2 e E2 da placa E destacaram-se pelo efeito inibitório e seus compostos foram testados individualmente (Figuras 41), sendo determinados os compostos responsáveis pelo efeito observado: D10, E08 e E09. Estes foram então testados em diferentes concentrações: 5, 10 e 20  $\mu$ M. Os compostos E08 e E09 também foram testados em conjunto, para avaliar possível efeito sinérgico destes compostos no resultado do teste da combinação E2 (Figura 42). Ademais, estes compostos também foram testados nas combinações D2 e E2 ou individualmente em ensaios de competição com o fago A10 pela ligação à GST-E6, havendo competição dos compostos D07, E08 e E09, com resultado limiar do composto D10 (Figura 43).

Figura 41 – Ensaio de competição do fago A2 com compostos da placa E pela ligação à GST-E6.



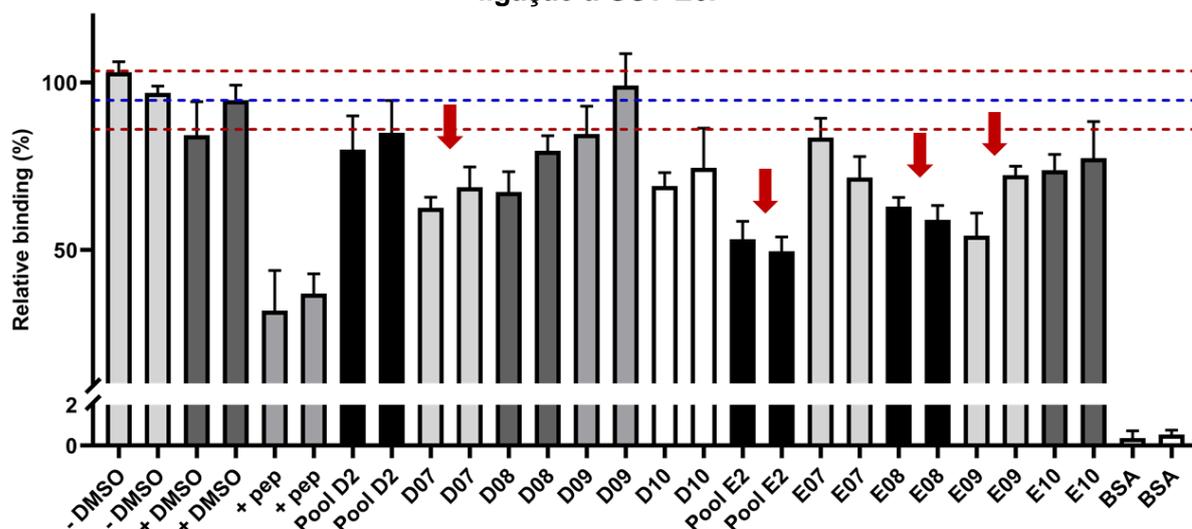
Ensaio de ligação de fagos na ausência ou presença de *pools* compostos do *Pandemic Response Box*. Os valores foram normalizados em relação ao controle sem competição (+ DMSO). A linha azul representa a média do controle e as linhas vermelhas, um desvio-padrão acima ou abaixo da média. As setas vermelhas destacam um *pool* e compostos cujas duplicatas estão abaixo de um desvio-padrão em relação à média dos controles. Pep = 10 $\mu$ M do peptídeo A2.

Figura 42 – Ensaio de competição do fago A2 com compostos da placa E pela ligação à GST-E6.



Ensaio de ligação de fagos na ausência ou presença de compostos do *Pandemic Response Box* nas concentrações de 5, 10 e 20  $\mu$ M. Os valores foram normalizados em relação ao controle sem competição (+ DMSO). A linha azul representa a média do controle e as linhas vermelhas, um desvio-padrão acima ou abaixo da média. As setas vermelhas destacam um *pool* e compostos cujas duplicatas estão abaixo de um desvio-padrão em relação à média dos controles. Pep = 10 $\mu$ M do peptídeo A2.

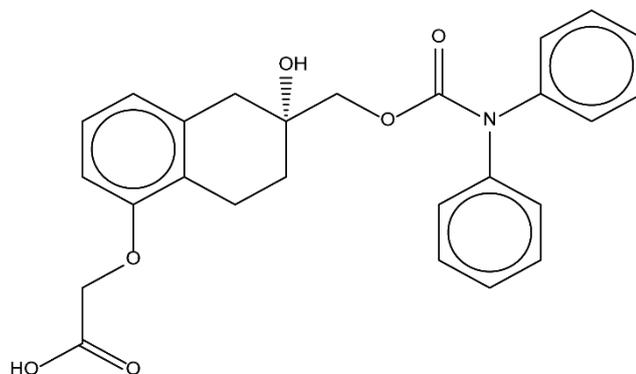
**Figura 43 – Ensaios de competição do fago A10 com pools e compostos da placa E pela ligação à GST-E6.**



Ensaio de ligação de fagos na ausência ou presença de *pools* compostos do *Pandemic Response Box*. Os valores foram normalizados em relação ao controle sem competição (+ DMSO). A linha azul representa a média do controle e as linhas vermelhas, um desvio-padrão acima ou abaixo da média. As setas vermelhas destacam um *pool* e compostos cujas duplicatas estão abaixo de um desvio-padrão em relação à média dos controles. Pep = 10 $\mu$ M do peptídeo A10.

O *Pandemic Response Box* é constituído por compostos antiprotozoário, antibacterianos e antivirais. Curiosamente, os compostos D10 (MMV1782352, ChEMBL196779), E08 (MMV1580498, ChEMBL2364624) e E09 (MMV1782211, ChEMBL1163676) fazem parte da divisão de antivirais do banco de pequenas moléculas *Pandemic Response Box* e suas estruturas estão demonstradas na Figura 44. Estes compostos foram aplicados em ensaios de viabilidade celular com as linhagens celulares C33a e HEK293T (HPV-negativas), SCC90 e SiHa (HPV16) e HeLa (HPV18). Nestes, o composto E09 reduziu significativamente a viabilidade das células SiHa, SCC90 e HeLa em cultura, embora tenha demonstrado algum efeito citotóxico nas linhagens C33a após 96 h. A linhagem SCC90 demonstrou-se particularmente sensível a todos os compostos, sendo mais afetada pela administração de E09 (Figuras 45 e 46).

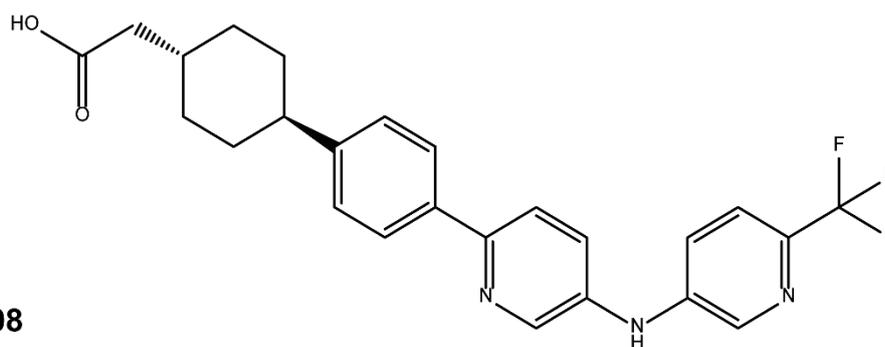
**Figura 44 – Compostos do *Pandemic Response Box* com potencial para inibição da atividade da proteína E6.**



**D10**

“FK-788”, PM: 446,49 Da

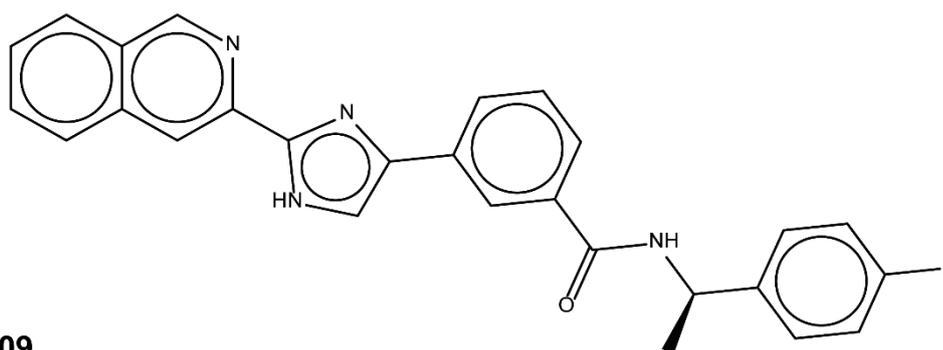
{{(6R)-6-[[Diphenylcarbamoyl]oxy]methyl}-6-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthalenyl]oxy}acetic acid



**E08**

“Pradigastat”, PM: 455.48 Da

{trans-4-[4-(5-[[6-(Trifluoromethyl)-3-pyridinyl]amino]-2-pyridinyl)phenyl]cyclohexyl}acetic acid



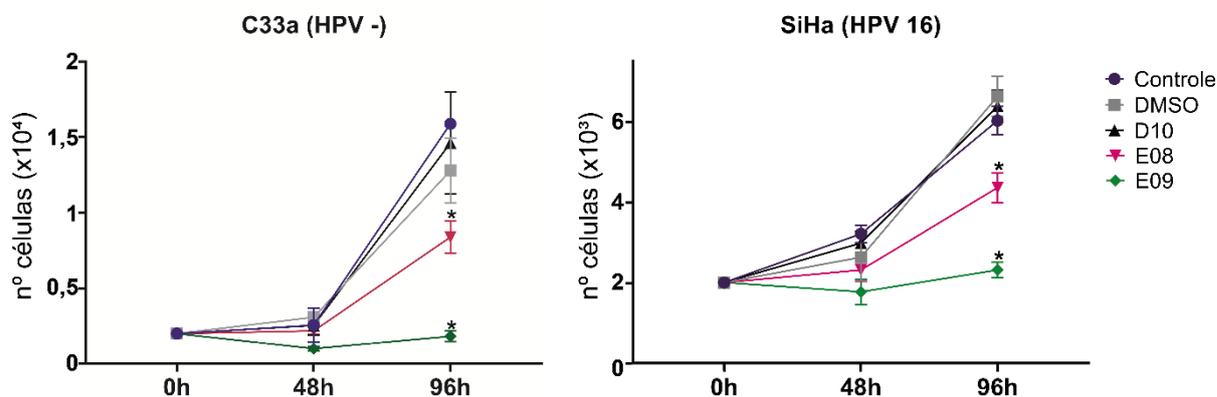
**E09**

“TTP-8307”, PM: 436,49 Da

N-[(1R)-1-(4-Fluorophenyl)ethyl]-3-[2-(3-isoquinolinyl)-1H-imidazol-5-yl]benzamide

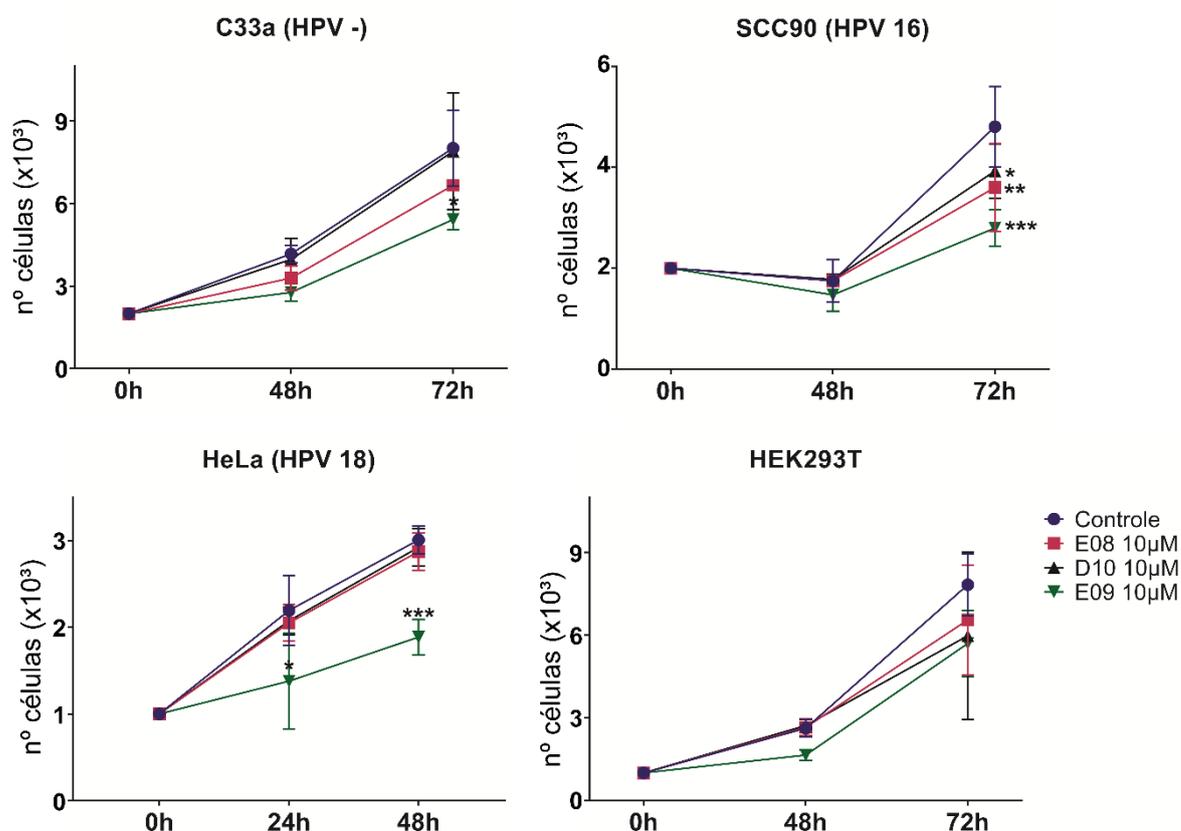
Estrutura química, nome popular, peso molecular (PM) e denominação dos compostos D10, E08, E09 do banco de pequenos compostos *Pandemic Response Box*.

**Figura 45 – Atividade metabólica de linhagens celulares tratadas com os compostos do Pandemic Response Box.**



Células C33a (direita) ou SiHa (esquerda) foram incubadas com 20  $\mu\text{M}$  ou sem os compostos individuais (24 a 72 h) e a atividade metabólica foi determinada pelo método de WST-1. A medida da absorbância foi utilizada para inferência do número de células por poço relativo ao número de células iniciais (0 h). Todas as condições foram testadas em triplicata. Dados representados pela média  $\pm$  desvio padrão. Two-way ANOVA com post-hoc test de Dunnett. \* $p < 0,05$ .

**Figura 46 – Atividade metabólica de linhagens celulares tratadas com os compostos do Pandemic Response Box.**



Células C33a, SCC90, HeLa e HEK293T foram incubadas com 10  $\mu\text{M}$  ou sem os compostos individuais (24 a 72 h) e a atividade metabólica foi determinada pelo método de WST-1. A medida da absorbância foi utilizada para inferência do número de células por poço relativo ao número de células iniciais (0h). Todas as condições foram testadas em triplicata. Dados representados pela média  $\pm$  desvio padrão. Two-way ANOVA com post-hoc test Dunnett, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 5. DISCUSSÃO

Desde a descoberta de que o silenciamento das oncoproteínas do HPV leva as células infectadas à apoptose, muitas estratégias para bloquear E6 foram propostas, desde peptídeos até anticorpos e compostos orgânicos (BUTZ et al., 2003; DYMALLA et al., 2009; VERACHI et al., 2018; CELEGATO et al., 2020). No presente trabalho, descrevemos uma sequência peptídica ligante de E6 inédita, que foi validada e teve seu sítio de ligação definido. A partir desta interação, desenvolvemos um método de varredura por *displacement screening* de banco de compostos que pode ser utilizado para avaliação preliminar de novos ligantes de E6 *in vitro* com menor custo e menos laborioso que os ensaios em linhagens celulares.

Embora diversas estratégias para o desenvolvimento de inibidores de E6 e E7 tenham sido propostas, nenhuma delas foi otimizada para uso terapêutico. Uma terapia-alvo direcionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV permitiria o tratamento dos indivíduos infectados durante a janela de infecção pelo HPV, precedendo o desenvolvimento tumoral. Ademais, esta estratégia terapêutica apresenta um diferencial importante: as oncoproteínas virais não tem similaridade com proteínas celulares (MITTAL; BANKS, 2017). Ou seja, assim como as terapias antimicrobianas, a possibilidade de desenvolvermos compostos com poucos efeitos colaterais e alta eficácia é altamente provável. Dentre as estratégias de inibição, já foram desenvolvidos peptídeos, aptâmeros de RNA, anticorpos em diferentes apresentações e pequenas moléculas orgânicas capazes de se ligar à E6 e impedir sua atividade na célula (LAGRANGE et al., 2007; DYMALLA et al., 2009; MALECKA et al., 2014; BONETTA et al., 2015; VERACHI et al., 2018; TOTEGMA et al., 2019). Embora muitos deles tenham tido sucesso nos ensaios *in vitro* e *in cell*, eles fracassaram nos testes pré-clínicos ou clínicos, demonstrando a dificuldade em

desenvolver bloqueadores para estas proteínas altamente especializadas em subverter o ciclo celular a seu favor (JANSEN et al., 2011; BASU et al., 2013; GARCIA et al., 2014).

Dentre os desafios no desenvolvimento de inibidores, podemos destacar primariamente a dificuldade em isolar ou produzir as proteínas E6 e E7 de HPV16 em sistemas heterólogos. A E6 é formada por 151 aminoácidos, sendo que 14 deles são cisteínas que formam pontes dissulfeto para estabilizar sua estrutura (NOMINE et al., 2001a). A correta formação destas pontes é um desafio na produção da proteína em sistema bacteriano, que carece de chaperonas para auxiliar no correto dobramento, favorecendo assim a agregação proteica (NOMINE et al., 2001b; LIU et al., 2009). Esta agregação pode ser reduzida com mutações em cisteínas não-conservadas (NOMINÉ et al., 2006; ZANIER et al., 2007; MARTINEZ-ZAPIEN et al., 2016). Esta estratégia é útil para estudos estruturais, mas pode introduzir viés nos estudos de seleção de ligantes. Um diferencial do nosso estudo foi, portanto, o uso da proteína E6 fusionada à GST, o que auxiliou no correto enovelamento desta oncoproteína, além de facilitar sua purificação, mantendo sua função sem a necessidade de introduzir mutações (BOON et al., 2015).

Já a E7, por sua vez, é formada por 98 aminoácidos, dos quais aproximadamente metade encontra-se em regiões intrinsecamente desordenadas que só se estabilizam na presença do ligante (GARCIA-ALAI, ALONSO E PRAT-GAY, 2007; CALÇADA et al., 2013). Tendo isto em mente, e buscando favorecer a seleção de ligantes nesta proteína, o *panning* foi feito em solução. Isto permitiria que a proteína se acomodasse estruturalmente em torno de um possível ligante peptídico; mas, ainda assim, não foi possível identificar (ou validar) ligantes promissores para esta proteína no presente estudo. Ademais, E7 é fosforilada em diferentes regiões da proteína nas

células infectadas, sendo sua atividade modulada por estas diferentes modificações pós-traducionais (NOGUEIRA et al., 2017; BASUKALA et al., 2019). Estas características são difíceis de serem reproduzidas na proteína recombinante produzida de forma heteróloga em bactéria.

Porém, vale ressaltar que a lista de potenciais ligantes para E7 já identificados na literatura é bastante extensa. Desta maneira, é possível que nossos resultados corroborem este fato, evidenciando que os diversos peptídeos identificados pelo *phage display* mimetizam diferentes pontos de ligação de proteínas-alvo de E7 distintas, sem que haja um motivo peptídico claro, como no caso do motivo *LxxLL* da oncoproteína E6.

Por outro lado, a proteína E6 apresenta uma conformação bem determinada, sendo a seleção de ligantes para ela bem-sucedida utilizando-se a proteína de fusão GST-E6 imobilizada em placa com etapas de clarificação contra GST em todos os ciclos. Por meio desta estratégia, foram selecionados peptídeos que, embora não apresentassem sequência primária idêntica, compartilham características físico-químicas importante e conservadas: um centro negativo flanqueado por aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos (Figura 11). Tais peptídeos apresentados pelos fagos foram validados pela interação específica em ensaios de ligação contra outras proteínas, como GST e E7, e pela competição com proteínas em solução e com anticorpos específicos anti-E6. Na forma de peptídeos sintéticos, A2 e A10 foram capazes de competir com seu fago correspondente e de forma cruzada, demonstrando afinidade pelo mesmo sítio de ligação em E6.

Até onde sabemos, as sequências de A2 e A10 são inéditas e nunca foram descritas em outros estudos de *phage* ou *yeast display* contra E6, enaltecendo a relevância da utilização das bibliotecas construídas em nosso laboratório (ELSTON et

al., 1998; BUTZ et al., 2000; DYMALLA et al., 2009, ZHU et al., 2021). Devido à estratégia de construção da biblioteca X6, alguns insertos encontrados (A10, C3) eram maiores do que o esperado, refletindo uma amplificação indesejada durante sua construção. Este fato demonstra a capacidade de seleção de peptídeos maiores que a biblioteca em questão, de até 24 aminoácidos, expostos no capsídeo de fagos, abrindo precedente para a construção de outras bibliotecas.

Como sequências inéditas, tornou-se necessário analisar o sítio de interação dos peptídeos na proteína E6, tarefa realizada por duas abordagens: produção isolada dos domínios da proteína e análises *in silico* da interação dos peptídeos com a E6. Ao produzir E6 contendo apenas a porção N ou a C-terminal, ficou evidente que a deleção de qualquer um dos domínios reduzia, mas não abolia, a ligação dos peptídeos A2 e A10, enquanto o domínio PDZ não contribuiu para a ligação (Figura 22). A hipótese de que o sítio de ligação do peptídeo A2 era composto por ambos os domínios N e C-terminais foi confirmada pelos estudos *in silico*. Por esta abordagem, foi demonstrado que o peptídeo A2 é capaz de se acomodar no bolso de ligação já descrito para os alvos celulares de E6, como IRF3 e E6AP. A E6AP é uma ubiquitina-ligase capaz de mediar a interação de E6 com diversas outras proteínas, como p53 e BAK, enquanto a ligação com IRF3 contribuiu para a evasão imune; em conjunto, todas estas interações evitam a apoptose da célula infectada por HPV e, em última instância, da célula tumoral que expressa E6 (TUNGTEAKKHUN; DUERKSEN-HUGHES, 2008). Tanto E6AP quanto IRF3 compartilham o motivo “LxxLL”, uma hélice formada por leucinas e resíduos ácidos, representados por “x”, que se acomoda no bolso de ligação rico em argininas (ZANIER et al., 2013). Apesar de A2 não compartilhar a sequência primária com tais motivos, suas características físico-químicas são

semelhantes e sua estrutura proposta por modelagem também é uma hélice, capaz de se sobrepor às hélices formadas pelos motivos *LxxLL* (Figura 26).

Por meio da simulação de dinâmica molecular, a interação de A2 no bolso de ligação de *LxxLL* da E6 foi estável, embora algumas ligações sejam de outra natureza ou ocupem posições diferentes quando comparados aos peptídeos de alvos canônicos de E6, como EDILDELLGNMV (PDB 6SJA), que faz parte de IRF3, e ELTLQELLGEER (PDB 4GIZ e 4XR8), parte da E6AP. Dentre as interações que diferem, destacam-se as *cátion-pi*, interações de anéis aromáticos dos resíduos de A2 com argininas do bolso de ligação de E6 (Arg129, Arg131), altamente estáveis durante a simulação. Sendo o *phage display* uma metodologia combinatorial de resíduos de aminoácidos, as bibliotecas apresentam virtualmente todas as combinações possíveis, incluindo as sequências *LxxLL* presentes nos ligantes de E6. Notavelmente, as sequências selecionadas foram capazes de deslocar a ligação destes motivos, uma vez que nenhum fago expondo sequências *LxxLL* foi identificado nos sequenciamentos após o *panning*. Neste sentido, é importante considerar a possibilidade de A2 e suas interações específicas serem capazes de deslocar a ligação dos alvos celulares com E6, ressaltando a importância das interações e sequências descobertas neste trabalho.

Com o intuito de utilizar a ligação do peptídeo A2 na proteína E6 como ferramenta para busca de outros ligantes desta proteína, nosso grupo desenvolveu um ensaio que possibilitou a varredura de um banco de compostos de baixo peso molecular. Trata-se de uma seleção de 400 compostos com atividade antibacteriana, antifúngica ou antiviral, disponibilizados pela iniciativa *Medicines for Malaria Venture* para impulsionar a descoberta de novas terapias para doenças negligenciadas. Embora os compostos tenham demonstrado efeito de competição com o fago A2 e

reduzido a proliferação das linhagens celulares, preferencialmente na dose de 10  $\mu$ M para as linhagens HPV-positivas (HeLa e SSC90), ainda demonstrou atividade inespecífica sobre a linhagem C33a, HPV-negativa. Assim, experimentos de otimização de dose e teste de compostos análogos podem conferir vantagens a um efeito HPV-específico. Ademais, o estabelecimento de controles de células não tumorais nestes experimentos é um desafio e, embora células epiteliais embrionárias de rim (HEK293T) não necessariamente reflitam o melhor modelo para controle de citotoxicidade inespecífica, não foram afetadas pelos compostos, sugerindo um efeito direcionado às células tumorais.

Além dos compostos testados, os próprios peptídeos foram avaliados quanto à sua capacidade de internalização e interferência na viabilidade celular. Os peptídeos sintéticos marcados com FITC foram analisados por citometria de fluxo e apenas FITC-PenA2 internalizou espontaneamente em quantidade considerável nas linhagens C33a e SiHa nas concentrações testadas (Figuras 32 e 33). Devido a dificuldades na solubilidade, a construção sem FITC foi encomendada (PenA2), e embora presuma-se que esta também seja capaz de atravessar a membrana celular, o peptídeo A2 fusionado à Penetratina não parece se ligar com alta afinidade à E6 (Figura 38). Este resultado é compreensível à luz da natureza química da Penetratina, um peptídeo de penetração celular, portanto com cargas positivas. Devido ao caráter negativo do peptídeo A2, é de se esperar que haja interações entre A2 e a Penetratina, reduzindo a capacidade de ligação de A2 à E6. A internalização dos fagos apresentando os peptídeos A2 e A10 também foi testado nas mesmas linhagens por imunofluorescência, mas não se mostrou consistente (Figuras 34 e 35). A partir da análise da viabilidade celular, buscou-se sugestões de que as vias de apoptose pudessem ser reativadas nestas células, o que era esperado para ligantes capazes

de interferir na ligação de E6 e E6AP. Nestes testes, FITC-PenA2 reduziu a viabilidade da linhagem C33a, um efeito inespecífico provavelmente relacionado a sua insolubilidade no meio de cultura e conseqüente presença de agregados sobre as células (Figura 36). O peptídeo PenA2 (sem a marcação por FITC) também foi testado, mas não apresentou resultados satisfatórios na inibição da viabilidade celular, sugerindo mais uma vez que a Penetratina poderia interferir na atividade de A2 (Figuras 39 e 40).

Embora peptídeos em geral não sejam bons fármacos, pela sua susceptibilidade à ação de proteases e incapacidade de atravessar membranas biológicas, eles são ferramentas úteis para o desenho racional de fármacos e de farmacóforos. Os farmacóforos permitem estabelecer exigências de interação mínimas necessárias a um determinado ligante para interagir com seu sítio de ligação. Esta abordagem já foi utilizada por Baleja e seus colaboradores (2006) e pode ser aplicada também ao peptídeo A2. As interações *cation- $\pi$*  descritas, por exemplo, podem ser mimetizadas por compostos aromáticos. De fato, a grande maioria dos compostos já caracterizados com potencial para inibir E6 apresentam anéis aromáticos (MALECKA et al., 2014; RIETZ et al., 2016; CLEMENTE-SOTO et al, 2019; RICCI-LOPEZ et al., 2019), assim como os compostos identificados no *Pandemic Response Box* descritos no presente trabalho.

É importante considerar que os peptídeos e compostos descritos neste estudo podem apresentar limitações para atravessar a membrana, manterem-se estáveis, distribuírem-se e atuar sobre a proteína E6 quando administrados às células em cultura. Isso pode explicar a inconsistência entre a ligação e a especificidade observadas nos ensaios com a proteína recombinante e a ausência de efeitos específicos nas linhagens celulares. Ademais, os peptídeos e compostos ainda podem

ter suas propriedades de ligação, estabilidade e farmacodinâmica otimizadas em estudos futuros.

Os testes *in vitro* podem ser laboriosos e limitar o número compostos a serem testados, mesmo nas varreduras em larga escala (MALECKA et al., 2014; CHITSIKE et al., 2021). Contudo, os ligantes peptídicos ou pequenos compostos encontrados aqui podem ser o elo entre inibidores recém-descobertos e uma terapia efetiva contra o HPV. Com a ampla gama de tecnologias de análise *in silico* disponíveis hoje e atualizadas em grande velocidade, os inibidores já descritos podem ser utilizados e comparados, servindo como *lead* para o desenvolvimento racional de fármacos (SOUMIA et al., 2022).

Finalmente, o novo ligante peptídico aqui descrito interage com aminoácidos altamente conservados nas proteínas E6 produzidas por HPV de alto risco oncogênico e mais prevalentes em tumores do colo do útero (HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58; Figura 31), demonstrando potencial para ser utilizado no desenho racional de um novo inibidor com atividade sobre todos estes tipos virais. Destaque-se que o HPV 16 é também o agente causal da grande maioria dos tumores de vulva, vagina, pênis, ânus e orofaringe atribuíveis a esta infecção viral (SANJOSE et al., 2018). Assim, este estudo constitui mais um passo no esforço para o desenvolvimento de uma terapia eficaz contra a infecção e tumorigênese HPV-induzida, além de contribuir para estudos estruturais da proteína E6. Estes avanços, finalmente, poderão contribuir para a evolução do tratamento e beneficiar os milhares de pacientes que sofrem com lesões e tumores induzidos pela infecção por HPV.

## 6. CONCLUSÕES

O câncer é um conjunto heterogêneo de doenças que afetam milhões de pessoas todos os anos e constituem importante causa de mortalidade e morbidade. Enquanto a maioria dos tumores só pode ser contida a custo da destruição de células saudáveis, o papel do papilomavírus humano no desenvolvimento de lesões precursoras e cânceres induzidos por esta infecção determina uma oportunidade única para o tratamento destas patologias, permitindo direcionar a terapia para um alvo exclusivamente viral, como a oncoproteína E6. Apesar do reconhecido sucesso das vacinas profiláticas contra o HPV, sua ação está condicionada à ausência de contato prévio com o vírus, excluindo os milhares de pacientes já acometidos por estas enfermidades. A ausência de fármacos eficazes e específicos para o tratamento da infecção e carcinogênese por HPV faz com que os pacientes sejam submetidos às mesmas terapias utilizadas para combater outros tumores, invasivas e debilitantes. Considerados estes pontos, torna-se imperativo o empenho no avanço do campo de pesquisa de tratamentos específicos, que levem em consideração o curso da doença por HPV. Neste cenário, nosso estudo constitui uma prova de conceito importante de que pequenas moléculas podem inibir a atividade das proteínas virais e busca contribuir, através da descrição de novas interações da oncoproteína E6, com o avanço no desenvolvimento de tratamentos específicos para combater a infecção e a tumorigênese induzida pelo HPV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

- ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, [S. l.], v. 1–2, p. 19–25, 2015. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
- ACCARDI, L.; DONÀ, M. G.; BONITO, P. D.; GIORGI, C. Intracellular anti-E7 human antibodies in single-chain format inhibit proliferation of HPV16-positive cervical carcinoma cells. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 116, n. 4, p. 564–570, 2005. DOI: 10.1002/ijc.21052.
- AKSOY, P.; GOTTSCHALK, E. Y.; MENESES, P. I. HPV entry into cells. **Mutation Research. Reviews in Mutation Research**, [S. l.], v. 772, p. 13–22, 2017. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.09.004.
- ARMSTRONG, D. J.; ROMAN, A. The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 192, n. 3, p. 1380–1387, 1993. DOI: 10.1006/bbrc.1993.1569.
- ASHRAFI, G. H.; HAGHSHENAS, M. R.; MARCHETTI, B.; O'BRIEN, P. M.; CAMPO, M. S. 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, 2005. DOI: 10.1002/ijc.20558.
- AVVAKUMOV, N.; TORCHIA, J.; MYMRYK, J. S. Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. **Oncogene**, [S. l.], v. 22, n. 25, p. 3833–3841, 2003. DOI: 10.1038/sj.onc.1206562.
- BASU P., DUTTA S., BEGUM R., MITTAL S., DUTTA P. D., BHARTI A. C., PANDA C. K., BISWAS J., DEY B., TALWAR G.P., DAS B.C. Clearance of cervical human papillomavirus infection by topical application of curcumin and curcumin containing polyherbal cream: a phase II randomized controlled study. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 5753–5759, 2013. DOI: 10.7314/apjcp.2013.14.10.5753.
- BASUKALA, O.; BANKS, L. The Not-So-Good, the Bad and the Ugly: HPV E5, E6 and E7 Oncoproteins in the Orchestration of Carcinogenesis. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 1892, 2021. DOI: 10.3390/v13101892.
- BASUKALA, O.; MITTAL, S.; MASSIMI, P.; BESTAGNO, M.; BANKS, L. The HPV-18 E7 CKII phospho acceptor site is required for maintaining the transformed phenotype of cervical tumour-derived cells. **PLoS pathogens**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. e1007769, 2019. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007769.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics (Oxford, England)**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 343–350, 2011. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq662.
- BEPPLER, J.; MKADDEM, S. B.; MICHALOSKI, J.; HONORATO, R. V.; VELASCO, I. T.; DE OLIVEIRA, P. S. L.; GIORDANO, R. J.; MONTEIRO, R. C.; PINHEIRO DA SILVA, F. Negative regulation of bacterial killing and inflammation by two novel CD16 ligands. **European Journal of Immunology**, [S. l.], v. 46, n. 8, p. 1926–1935, 2016. DOI: 10.1002/eji.201546118.
- BERGVALL, M.; MELENDY, T.; ARCHAMBAULT, J.. The E1 proteins. **Virology**, [S. l.], v. 445, n. 1–2, p. 35–56, 2013. DOI: 10.1016/j.virol.2013.07.020.

---

<sup>1</sup>De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

BODILY, J. M.; MEHTA, K. P. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus E7 enhances hypoxia-inducible factor 1-mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases. **Cancer Research**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 1187–1195, 2011. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2626.

BONETTA, A. C.; MAILLY, L.; ROBINET, E.; TRAVÉ, G.; MASSON, M.; DERYCKERE, François. Artificial microRNAs against the viral E6 protein provoke apoptosis in HPV positive cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 465, n. 4, p. 658–664, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.144.

BOON, S. S.; TOMAIĆ, V.; THOMAS, M.; ROBERTS, S.; BANKS, L.. Cancer-causing human papillomavirus E6 proteins display major differences in the phospho-regulation of their PDZ interactions. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 89, n. 3, p. 1579–1586, 2015. DOI: 10.1128/JVI.01961-14.

BRUNI, L., SAURA-LÁZARO, A., MONTOLIU, A., BROTONS, M., ALEMANY, L., DIALLO, M. S., AFSAR, O. Z., LAMONTAGNE, D. S., MOSINA, L., CONTRERAS, M., VELANDIA-GONZÁLEZ, M., PASTORE, R., GACIC-DOBO, M., & BLOEM, P. HPV vaccination introduction worldwide and WHO and UNICEF estimates of national HPV immunization coverage 2010-2019. **Preventive Medicine**, [S. l.], v. 144, p. 106399, 2021. DOI: 10.1016/j.ypmed.2020.106399.

BURCHELL, A.N.; WINER, R. L.; DE SANJOSÉ, S.; FRANCO, E. L. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, [S. l.], v. 24 Suppl 3, p. S3/52-61, 2006. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.05.031.

BURGERS, W. A.; BLANCHON, L.; PRADHAN, S.; DE LAUNOIT, Y.; KOUZARIDES, T.; FUKS, F. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. **Oncogene**, [S. l.], v. 26, n. 11, p. 1650–1655, 2007. DOI: 10.1038/sj.onc.1209950.

BUTZ, K.; DENK, C.; ULLMANN, A.; SCHEFFNER, M.; HOPPE-SEYLER, F. Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 97, n. 12, p. 6693–6697, 2000. DOI: 10.1073/pnas.110538897.

BUTZ, K.; RISTRANI, T.; HENGSTERMANN, A.; DENK, C.; SCHEFFNER, M.; HOPPE-SEYLER, F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. **Oncogene**, [S. l.], v. 22, n. 38, p. 5938–5945, 2003. DOI: 10.1038/sj.onc.1206894.

CALÇADA, E. O.; FELLI, I. C.; HOŠEK, T.; PIERATTELLI, R.. The heterogeneous structural behavior of E7 from HPV16 revealed by NMR spectroscopy. **ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology**, [S. l.], v. 14, n. 14, p. 1876–1882, 2013. DOI: 10.1002/cbic.201300172.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, [S. l.], v. 517, n. 7536, p. 576–582, 2015. DOI: 10.1038/nature14129.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. **Nature**, [S. l.], v. 543, n. 7645, p. 378–384, 2017. DOI: 10.1038/nature21386.

CASTLE, P. E., RODRÍGUEZ, A. C., BURK, R. D., HERRERO, R., WACHOLDER, S., ALFARO, M., MORALES, J., GUILLEN, D., SHERMAN, M. E., SOLOMON, D., SCHIFFMAN, M., & PROYECTO EPIDEMIOLOGICO GUANACASTE (PEG) GROUP. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. **BMJ (Clinical research ed.)**, [S. l.], v. 339, p. b2569, 2009.

CELEGATO, M., MESSA, L., GORACCI, L., MERCORELLI, B., BERTAGNIN, C., SPYRAKIS, F., SUAREZ, I., COUSIDO-SIAH, A., TRAVÉ, G., BANKS, L., CRUCIANI, G., PALÙ, G., & LOREGIAN, A. A novel small-molecule inhibitor of the human papillomavirus E6-p53 interaction that reactivates p53 function and blocks cancer cells growth. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 470, p. 115–125, 2020. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.10.046.

CHESSON, H. W.; DUNNE, E. F.; HARIRI, S.; MARKOWITZ, L. E. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. **Sexually Transmitted Diseases**, [S. l.], v. 41, n. 11, p. 660–664, 2014. DOI: 10.1097/OLQ.000000000000193.

CHITSIKE, L.; YUAN, C. H.; ROY, A.; BOYLE, K.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. A high-content AlphaScreen™ identifies E6-specific small molecule inhibitors as potential therapeutics for HPV+ head and neck squamous cell carcinomas. **Oncotarget**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 549–561, 2021. DOI: 10.18632/oncotarget.27908.

CLEMENTE-SOTO, A. F.; SALAS-VIDAL, E.; MILAN-PACHECO, C.; SÁNCHEZ-CARRANZA, J. N.; PERALTA-ZARAGOZA, O.; GONZÁLEZ-MAYA, L. Quercetin induces G2 phase arrest and apoptosis with the activation of p53 in an E6 expression-independent manner in HPV-positive human cervical cancer-derived cells. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 2097–2106, 2019. DOI: 10.3892/mmr.2019.9850.

CONTRERAS-PAREDES, A.; DE LA CRUZ-HERNÁNDEZ, E.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, I.; DUEÑAS-GONZÁLEZ, A.; LIZANO, M. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. **Virology**, [S. l.], v. 383, n. 1, p. 78–85, 2009. DOI: 10.1016/j.virol.2008.09.040.

D’COSTA, Z. J.; JOLLY, C.; ANDROPHY, E. J.; MERCER, A.; MATTHEWS, C. M.; HIBMA, M. H. Transcriptional repression of E-cadherin by human papillomavirus type 16 E6. **PLoS One**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. e48954, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0048954.

DE MARTEL, C.; GEORGES, D.; BRAY, F.; FERLAY, J.; CLIFFORD, G. M. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet. Global Health**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. e180–e190, 2020. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7.

DE MARTEL, C.; PLUMMER, M.; VIGNAT, J.; FRANCESCHI, S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 141, n. 4, p. 664–670, 2017. DOI: 10.1002/ijc.30716.

DE SANJOSÉ, S., SERRANO, B., TOUS, S., ALEJO, M., LLOVERAS, B., QUIRÓS, B., CLAVERO, O., VIDAL, A., FERRÁNDIZ-PULIDO, C., PAVÓN, M. Á., HOLZINGER, D., HALEC, G., TOMMASINO, M., QUINT, W., PAWLITA, M., MUÑOZ, N., BOSCH, F. X., ALEMANY, L., & RIS HPV TT, VVAP AND HEAD AND NECK STUDY GROUPS. Burden of Human Papillomavirus (HPV)-Related Cancers Attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. **JNCI cancer spectrum**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. pky045, 2018. DOI: 10.1093/jncics/pky045.

DE VILLIERS, E. M.. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, [S. l.], v. 445, n. 1–2, p. 2–10, 2013. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.023.

DE VUYST, H.; CLIFFORD, G. M.; NASCIMENTO, M. C.; MADELEINE, M. M.; FRANCESCHI, S.. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 124, n. 7, p. 1626–1636, 2009. DOI: 10.1002/ijc.24116.

DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. **Virology**, [S. l.], v. 445, n. 1–2, p. 99–114, 2013. DOI: 10.1016/j.virol.2013.05.006.

DISBROW, G. L.; HANOVER, J.A.; SCHLEGEL, R.. Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 79, n. 9, p. 5839–5846, 2005. DOI: 10.1128/JVI.79.9.5839-5846.2005.

DOORBAR, J.. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, [S. l.], v. 32 Suppl 1, p. S7-15, 2005. DOI: 10.1016/j.jcv.2004.12.006.

DOORBAR, J.. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science (London, England: 1979)**, [S. l.], v. 110, n. 5, p. 525–541, 2006. DOI: 10.1042/CS20050369.

DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H.; KRANJEC, C.; MURAKAMI, I.. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, [S. l.], v. 25 Suppl 1, p. 2–23, 2015. DOI: 10.1002/rmv.1822.

DROLET, M., BÉNARD, É., PÉREZ, N., BRISSON, M., & HPV VACCINATION IMPACT STUDY GROUP. Population-level impact and herd effects following the introduction of human papillomavirus vaccination programmes: updated systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, [S. l.], v. 394, n. 10197, p. 497–509, 2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30298-3.

DYMALLA, S.; SCHEFFNER, M.; WEBER, E.; SEHR, P.; LOHREY, C.; HOPPE-SEYLER, F.; HOPPE-SEYLER, K.. A novel peptide motif binding to and blocking the intracellular activity of the human papillomavirus E6 oncoprotein. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, [S. l.], v. 87, n. 3, p. 321–331, 2009. DOI: 10.1007/s00109-008-0432-1.

ELSTON, R. C.; NAPTHINE, S.; DOORBAR, J. The identification of a conserved binding motif within human papillomavirus type 16 E6 binding peptides, E6AP and E6BP. **The Journal of General Virology**, [S. l.], v. 79 ( Pt 2), p. 371–374, 1998. DOI: 10.1099/0022-1317-79-2-371.

ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENOM, M. A.; MADHUSUDHAN, M. S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.Y.; PIEPER, U.; SALI, A.. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics**, [S. l.], v. Chapter 5, p. Unit-5.6, 2006. DOI: 10.1002/0471250953.bi0506s15.

FILIPPOVA, M.; JOHNSON, M. M.; BAUTISTA, M.; FILIPPOV, V.; FODOR, N.; TUNGTEAKKHUN, S. S.; WILLIAMS, K.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. The Large and Small Isoforms of Human Papillomavirus Type 16 E6 Bind to and Differentially Affect Procaspase 8 Stability and Activity. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 81, n. 8, p. 4116–4129, 2007. DOI: 10.1128/JVI.01924-06.

FILIPPOVA, M.; PARKHURST, L.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 279, n. 24, p. 25729–25744, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M401172200.

FRANCO, E.; VILLA, L.; ROHAN, T.; FERENCZY, A.; PETZL-ERLER, M.; MATLASHEWSKI, G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill Study Group. **Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 223–233, 1999.

FUNK, J. O.; WAGA, S.; HARRY, J. B.; ESPLING, E.; STILLMAN, B.; GALLOWAY, D. A. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. **Genes & Development**, [S. l.], v. 11, n. 16, p. 2090–2100, 1997. DOI: 10.1101/gad.11.16.2090.

GANTI, K., MASSIMI, P., MANZO-MERINO, J., TOMAIĆ, V., PIM, D., PLAYFORD, M. P., LIZANO, M., ROBERTS, S., KRANJEC, C., DOORBAR, J., & BANKS, L. Interaction of the Human Papillomavirus E6 Oncoprotein with Sorting Nexin 27 Modulates Endocytic Cargo Transport Pathways. **PLoS pathogens**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. e1005854, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005854.

- GARCIA, F. A. R.; CORNELISON, T.; NUÑO, T.; GREENSPAN, D. L.; BYRON, J.W.; HSU, C. H.; ALBERTS, D. S.; CHOW, H. H. S. Results of a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Polyphenon E in women with persistent high-risk HPV infection and low-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, [S. l.], v. 132, n. 2, p. 377–382, 2014. DOI: 10.1016/j.ygyno.2013.12.034.
- GARCÍA-ALAI, M. M.; ALONSO, L. G.; DE PRAT-GAY, G.. The N-terminal module of HPV16 E7 is an intrinsically disordered domain that confers conformational and recognition plasticity to the oncoprotein. **Biochemistry**, [S. l.], v. 46, n. 37, p. 10405–10412, 2007. DOI: 10.1021/bi7007917.
- GARDIOL, D.; KÜHNE, C.; GLAUNSINGER, B.; LEE, S. S.; JAVIER, R.; BANKS, L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. **Oncogene**, [S. l.], v. 18, n. 40, p. 5487–5496, 1999. DOI: 10.1038/sj.onc.1202920.
- GIORDANO, R. J.; CARDÓ-VILA, M.; LAHDENRANTA, J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 1249–1253, 2001. DOI: 10.1038/nm1101-1249.
- GRAHAM, S.V. Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation. **Viruses**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. E245, 2017. DOI: 10.3390/v9090245.
- GRANT, S. G.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 87, n. 12, p. 4645–4649, 1990. DOI: 10.1073/pnas.87.12.4645
- GUO, C.; LIU, K.; ZHENG, Y.; LUO, H.; CHEN, H.; HUANG, L. Apoptosis induced by an antagonist peptide against HPV16 E7 in vitro and in vivo via restoration of p53. **Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 606–618, 2011. DOI: 10.1007/s10495-011-0594-0.
- HELLNER, K.; MAR, J.; FANG, F.; QUACKENBUSH, J.; MÜNGER, K.. HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. **Virology**, [S. l.], v. 391, n. 1, p. 57–63, 2009. DOI: 10.1016/j.virol.2009.05.036.
- HELT, A. M.; FUNK, J. O.; GALLOWAY, D. A. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 76, n. 20, p. 10559–10568, 2002.
- HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997. DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H.
- HU, L.; CERESA, B. P. Characterization of the plasma membrane localization and orientation of HPV16 E5 for cell-cell fusion. **Virology**, [S. l.], v. 393, n. 1, p. 135–143, 2009. DOI: 10.1016/j.virol.2009.07.034.
- HU, T.; FERRIL, S.; SNIDER, A.; BARBOSA, M. In-vivo analysis of hpv e7 protein association with prb, p107 and p130. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 167–174, 1995. DOI: 10.3892/ijco.6.1.167.
- HUH, K.W.; ZHOU, X.; HAYAKAWA, H.; CHO, J. Y.; LIBERMANN, T. A.; JIN, J.; HARPER, J. W.; MÜNGER, K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 81, n. 18, p. 9737–9747, 2007. DOI: 10.1128/JVI.00881-07.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 33–38, 27–28, 1996. DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 119, n. 5, p. 1108–1124, 2006. DOI: 10.1002/ijc.21953.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. **Lancet (London, England)**, [S. l.], v. 370, n. 9599, p. 1609–1621, 2007. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61684-5.

JANSEN, F. H.; ADOUBI, I.; J C, K. C.; DE CNODDER, T.; JANSEN, N.; TSCHULAKOW, A.; EFFERTH, T. First study of oral Artenimol-R in advanced cervical cancer: clinical benefit, tolerability and tumor markers. **Anticancer Research**, [S. l.], v. 31, n. 12, p. 4417–4422, 2011.

JUBAIR, L.; FALLAHA, S.; MCMILLAN, N. A. J. Systemic Delivery of CRISPR/Cas9 Targeting HPV Oncogenes Is Effective at Eliminating Established Tumors. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 27, n. 12, p. 2091–2099, 2019. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.08.012.

KADAJA, M.; ISOK-PAAS, H.; LAOS, T.; USTAV, E.; USTAV, M.. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. **PLoS pathogens**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. e1000397, 2009. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000397.

KARLSSON, O. A., RAMIREZ, J., ÖBERG, D., MALMQVIST, T., ENGSTRÖM, Å., FRIBERG, M., CHI, C. N., WIDERSTEN, M., TRAVÉ, G., NILSSON, M. T., & JEMTH, P. Design of a PDZbody, a bivalent binder of the E6 protein from human papillomavirus. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 5, p. 9382, 2015. DOI: 10.1038/srep09382.

KASPAR, A. A.; REICHERT, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 18, n. 17–18, p. 807–817, 2013. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.05.011.

KLAUDA, J. B.; VENABLE, R. M.; FREITES, J. A.; O'CONNOR, J. W.; TOBIAS, D. J.; MONDRAGON-RAMIREZ, C.; VOROBYOV, I.; MACKERELL, A. D.; PASTOR, R. W. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. **The Journal of Physical Chemistry. B**, [S. l.], v. 114, n. 23, p. 7830–7843, 2010. DOI: 10.1021/jp101759q.

KLEBER-JANKE, T.; BECKER, W. M. Use of modified BL21(DE3) Escherichia coli cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. **Protein Expression and Purification**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 419–424, 2000. DOI: 10.1006/prev.2000.1265.

KOPS, N. L., CAIERÃO, J., BESSEL, M., HORVATH, J. D. C., DOMINGUES, C. M., BENZAKEN, A. S., VILLA, L. L., DE SOUZA, F. M. A., PEREIRA, G. F. M., & WENDLAND, E. M. Behavioral factors associated with multiple-type HPV genital infections: data from a cross-sectional study in young women in Brazil. **Reproductive Health**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 201, 2021. DOI: 10.1186/s12978-021-01244-2.

LAGRANGE, M.; BOULADE-LADAME, C.; MAILLY, L.; WEISS, E.; ORFANOUDAKIS, G.; DERYCKERE, F.. Intracellular scFvs against the viral E6 oncoprotein provoke apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 361, n. 2, p. 487–492, 2007. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.07.040.

LAMIABLE, A.; THÉVENET, P.; REY, J.; VAVRUSA, M.; DERREUMAUX, P.; TUFFÉRY, P. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. W1, p. W449-454, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw329.

- LICHTIG, H.; GILBOA, D. A.; JACKMAN, A.; GONEN, P.; LEVAV-COHEN, Y.; HAUPT, Y.; SHERMAN, L.. HPV16 E6 augments Wnt signaling in an E6AP-dependent manner. **Virology**, [S. l.], v. 396, n. 1, p. 47–58, 2010. DOI: 10.1016/j.virol.2009.10.011.
- LINDAHL, E.; ABRAHAM, M.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 2020 Manual (Version 2020). **Zenodo**. 2020. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3562512>
- LIU, Y.; CHERRY, J. J.; DINEEN, J. V.; ANDROPHY, E. J.; BALEJA, J. D. Determinants of Stability for the E6 Protein of Papillomavirus Type 16. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 386, n. 4, p. 1123–1137, 2009. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.01.018.
- LÓPEZ-OCEJO, O.; VILORIA-PETIT, A.; BEQUET-ROMERO, M.; MUKHOPADHYAY, D.; RAK, J.; KERBEL, R. S. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. **Oncogene**, [S. l.], v. 19, n. 40, p. 4611–4620, 2000. DOI: 10.1038/sj.onc.1203817.
- MACCHIAGODENA, M.; PAGLIAI, M.; ANDREINI, C.; ROSATO, A.; PROCACCI, P.. Upgraded AMBER Force Field for Zinc-Binding Residues and Ligands for Predicting Structural Properties and Binding Affinities in Zinc-Proteins. **ACS omega**, [S. l.], v. 5, n. 25, p. 15301–15310, 2020. DOI: 10.1021/acsomega.0c01337.
- MADEIRA, F., PARK, Y. M., LEE, J., BUSO, N., GUR, T., MADHUSOODANAN, N., BASUTKAR, P., TIVEY, A. R. N., POTTER, S. C., FINN, R. D., & LOPEZ, R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 47, n. W1, p. W636–W641, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz268.
- MALECKA, K. A.; FERA, D.; SCHULTZ, D. C.; HODAWADEKAR, S.; REICHMAN, M.; DONOVER, P. S.; MURPHY, M. E.; MARMORSTEIN, R. Identification and characterization of small molecule human papillomavirus E6 inhibitors. **ACS chemical biology**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 1603–1612, 2014. DOI: 10.1021/cb500229d.
- MARTINEZ-ZAPIEN, D., RUIZ, F. X., POIRSON, J., MITSCHLER, A., RAMIREZ, J., FORSTER, A., COUSIDO-SIAH, A., MASSON, M., VANDE POL, S., PODJARNY, A., TRAVÉ, G., & ZANIER, K. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. **Nature**, [S. l.], v. 529, n. 7587, p. 541–545, 2016. DOI: 10.1038/nature16481.
- MASSIMI, P.; BANKS, L. Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle. **Virology**, [S. l.], v. 276, n. 2, p. 388–394, 2000. DOI: 10.1006/viro.2000.0514.
- MCBRIDE, A. A. The papillomavirus E2 proteins. **Virology**, [S. l.], v. 445, n. 1–2, p. 57–79, 2013. DOI: 10.1016/j.virol.2013.06.006.
- MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; CRUM, C. P.; MÜNGER, K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 108, n. 5, p. 2130–2135, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1009933108.
- MICHALOSKI, J. S.; REDONDO, A. R.; MAGALHÃES, L. S.; CAMBUI, C. C.; GIORDANO, R. J. Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors. **Science Advances**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. e1600611, 2016. DOI: 10.1126/sciadv.1600611.
- MITCHELL, M. F.; HITTELMAN, W. N.; HONG, W. K.; LOTAN, R.; SCHOTTENFELD, D. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: an argument for intermediate endpoint biomarkers. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, [S. l.], v. 3, n. 7, p. 619–626, 1994.

MITTAL, S.; BANKS, L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. **Mutation Research. Reviews in Mutation Research**, [S. l.], v. 772, p. 23–35, 2017. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.08.001.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews. Cancer**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010. DOI: 10.1038/nrc2886.

MOSCICKI, A. B., MA, Y., FARHAT, S., JAY, J., HANSON, E., BENNINGFIELD, S., JONTE, J., GODWIN-MEDINA, C., WILSON, R., & SHIBOSKI, S. Natural history of anal human papillomavirus infection in heterosexual women and risks associated with persistence. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [S. l.], v. 58, n. 6, p. 804–811, 2014. DOI: 10.1093/cid/cit947.

MUNGER, K. Viruses and Cancer: An Accidental Journey. **PLoS pathogens**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. e1005573, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005573.

MÜNGER, K.; BALDWIN, A.; EDWARDS, K. M.; HAYAKAWA, H.; NGUYEN, C. L.; OWENS, M.; GRACE, M.; HUH, K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 78, n. 21, p. 11451–11460, 2004. DOI: 10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004.

NGUYEN, C. L.; EICHWALD, C.; NIBERT, M. L.; MÜNGER, K.. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 81, n. 24, p. 13533–13543, 2007. DOI: 10.1128/JVI.01669-07.

NOGUEIRA, M. O.; HOŠEK, T.; CALÇADA, E. O.; CASTIGLIA, F.; MASSIMI, P.; BANKS, L.; FELLI, I. C.; PIERATTELLI, R. Monitoring HPV-16 E7 phosphorylation events. **Virology**, [S. l.], v. 503, p. 70–75, 2017. DOI: 10.1016/j.virol.2016.12.030.

NOMINÉ, Y.; RISTRANI, T.; LAURENT, C.; LEFÈVRE, J. F.; WEISS E, N.; TRAVÉ, G. A strategy for optimizing the monodispersity of fusion proteins: application to purification of recombinant HPV E6 oncoprotein. **Protein Engineering**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 297–305, 2001. a. DOI: 10.1093/protein/14.4.297.

NOMINÉ, Y.; RISTRANI, T.; LAURENT, C.; LEFÈVRE, J. F.; WEISS E, Null; TRAVÉ, G. Formation of soluble inclusion bodies by hpv e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein. **Protein Expression and Purification**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 22–32, 2001. b. DOI: 10.1006/prev.2001.1451.

NOMINÉ, Y., MASSON, M., CHARBONNIER, S., ZANIER, K., RISTRANI, T., DERYCKÈRE, F., SIBLER, A. P., DESPLANCQ, D., ATKINSON, R. A., WEISS, E., ORFANOUDAKIS, G., KIEFFER, B., & TRAVÉ, G. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 665–678, 2006. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.01.024.

OH, S. T.; KYO, S.; LAIMINS, L. A. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 75, n. 12, p. 5559–5566, 2001. DOI: 10.1128/JVI.75.12.5559-5566.2001.

OYERVIDES-MUÑOZ, M. A.; PÉREZ-MAYA, A. A.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, H.F.; GÓMEZ-MACIAS, G. S.; FAJARDO-RAMÍREZ, O. R.; TREVIÑO, V.; BARRERA-SALDAÑA, H. A.; GARZA-RODRÍGUEZ, M. L.. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, [S. l.], v. 61, p. 134–144, 2018. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.03.003.

PASQUALINI, R., MILLIKAN, R. E., CHRISTIANSON, D. R., CARDÓ-VILA, M., DRIESSEN, W. H., GIORDANO, R. J., HAJITOU, A., HOANG, A. G., WEN, S., BARNHART, K. F., BAZE, W. B., MARCOTT, V. D., HAWKE, D. H., DO, K. A., NAVONE, N. M., EFSTATHIOU, E., TRONCOSO, P., LOBB, R. R., LOGOTHETIS, C. J., & ARAP, W. Targeting the interleukin-11 receptor  $\alpha$  in metastatic prostate cancer: A first-in-man study. **Cancer**, [S. l.], v. 121, n. 14, p. 2411–2421, 2015. DOI: 10.1002/cncr.29344.

**Ph.D.<sup>TM</sup>-12 Phage Display Peptide Library Kit | NEB**. [s.d.]. Disponível em: <https://international.neb.com/products/e8110-phd-12-phage-display-peptide-library-kit#Product%20Information>. Acesso em: 14 nov. 2022.

PHELPS, W. C.; MÜNGER, K.; YEE, C. L.; BARNES, J. A.; HOWLEY, P. M. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 66, n. 4, p. 2418–2427, 1992. DOI: 10.1128/JVI.66.4.2418-2427.1992.

PHILLIPS, J. C., BRAUN, R., WANG, W., GUMBART, J., TAJKHORSHID, E., VILLA, E., CHIPOT, C., SKEEL, R. D., KALÉ, L., & SCHULTEN, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 16, p. 1781–1802, 2005. DOI: 10.1002/jcc.20289.

PIM, D.; BANKS, L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, [S. l.], v. 118, n. 6–7, p. 471–493, 2010. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2010.02618.x.

POIRSON, J., SUAREZ, I. P., STRAUB, M. L., COUSIDO-SIAH, A., PEIXOTO, P., HERVOUET, E., FOSTER, A., MITSCHLER, A., MUKOBO, N., CHEBARO, Y., GARCIN, D., RECBERLIK, S., GAIDDON, C., ALTSCHUH, D., NOMINÉ, Y., PODJARNY, A., TRAVE, G., & MASSON, M. High-Risk Mucosal Human Papillomavirus 16 (HPV16) E6 Protein and Cutaneous HPV5 and HPV8 E6 Proteins Employ Distinct Strategies To Interfere with Interferon Regulatory Factor 3-Mediated Beta Interferon Expression. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 96, n. 10, p. e0187521, 2022. DOI: 10.1128/jvi.01875-21.

PUCKETT, C. A.; BARTON, J. K. Fluorescein redirects a ruthenium-octaarginine conjugate to the nucleus. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 131, n. 25, p. 8738–8739, 2009. DOI: 10.1021/ja9025165.

RAMOS, C. R. R.; ABREU, P. a. E.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; HO, P. L. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 1103–1109, 2004. DOI: /S0100-879X2004000800001.

REN, S., GAYKALOVA, D. A., GUO, T., FAVOROV, A. V., FERTIG, E. J., TAMAYO, P., CALLEJAS-VALERA, J. L., ALLEVATO, M., GILARDI, M., SANTOS, J., FUKUSUMI, T., SAKAI, A., ANDO, M., SADAT, S., LIU, C., XU, G., FISCH, K. M., WANG, Z., MOLINOLO, A. A., GUTKIND, J. S., ... CALIFANO, J. A. HPV E2, E4, E5 drive alternative carcinogenic pathways in HPV positive cancers. **Oncogene**, [S. l.], v. 39, n. 40, p. 6327–6339, 2020. DOI: 10.1038/s41388-020-01431-8.

RICCI-LÓPEZ, J.; VIDAL-LIMON, A.; ZUNÑIGA, M.; JIMÈNEZ, V. A.; ALDERETE, J. B.; BRIZUELA, C. A.; AGUILA, S. Molecular modeling simulation studies reveal new potential inhibitors against HPV E6 protein. **PLoS One**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. e0213028, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0213028.

RIETZ, A.; PETROV, D. P.; BARTOLOWITS, M.; DESMET, M.; DAVISSON, V. J.; ANDROPHY, E. J. Molecular Probing of the HPV-16 E6 Protein Alpha Helix Binding Groove with Small Molecule Inhibitors. **PLoS One**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. e0149845, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0149845.

RONCO, L. V.; KARPOVA, A. Y.; VIDAL, M.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes & Development**, [S. l.], v. 12, n. 13, p. 2061–2072, 1998.

KAUR, R. **The Sun and Her Flowers**. 1st ed. United States: Andrews Mcmeel Publishing, 2017. 256p. ISBN: 978-1449486792.

SALENTIN, S.; SCHREIBER, S.; HAUPT, V. J.; ADASME, M. F.; SCHROEDER, M.. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 43, n. W1, p. W443-447, 2015. DOI: 10.1093/nar/gkv315.

SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J. M.; VIERSTRA, R. D.; HOWLEY, P. M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, [S. l.], v. 75, n. 3, p. 495–505, 1993. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90384-3.

SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, [S. l.], v. 63, n. 6, p. 1129–1136, 1990.

SCHIFFMAN, M.; DOORBAR, J.; WENTZENSEN, N.; DE SANJOSÉ, S.; FAKHRY, C.; MONK, B. J.; STANLEY, M. A.; FRANCESCHI, S. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews. Disease Primers**, [S. l.], v. 2, p. 16086, 2016. DOI: 10.1038/nrdp.2016.86.

SCHWARTZ, S. Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. **Virology**, [S. l.], v. 445, n. 1–2, p. 187–196, 2013. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.034.

SERRANO, B.; BROTONS, M.; BOSCH, F. X.; BRUNI, L.. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [S. l.], v. 47, p. 14–26, 2018. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006.

SIEVERS, F., WILM, A., DINEEN, D., GIBSON, T. J., KARPLUS, K., LI, W., LOPEZ, R., MCWILLIAM, H., REMMERT, M., SÖDING, J., THOMPSON, J. D., & HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, [S. l.], v. 7, p. 539, 2011. DOI: 10.1038/msb.2011.75.

SKINNER, S. R., WHEELER, C. M., ROMANOWSKI, B., CASTELLSAGUÉ, X., LAZCANO-PONCE, E., DEL ROSARIO-RAYMUNDO, M. R., VALLEJOS, C., MINKINA, G., PEREIRA DA SILVA, D., MCNEIL, S., PRILEPSKAYA, V., GOGOTADZE, I., MONEY, D., GARLAND, S. M., ROMANENKO, V., HARPER, D. M., LEVIN, M. J., CHATTERJEE, A., GEERAERTS, B., STRUYF, F., ... VIVIANE STUDY GROUP (2016). Progression of HPV infection to detectable cervical lesions or clearance in adult women: Analysis of the control arm of the VIVIANE study. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 138, n. 10, p. 2428–2438, 2016. DOI: 10.1002/ijc.29971.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.

SMITH, G. P.; PETRENKO, Valery A. Phage Display. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 391–410, 1997.

SOUMIA, M.; HAJJI, H.; EL MZIBRI, M.; YOUNES, F. Zegzouti; MOHAMMED, B.; MOHAMED, B.; BENAÏSSA, M.. In-Silico Molecular Modeling Studies to Identify Novel Potential Inhibitors of HPV E6 Protein. **Vaccines**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1452, 2022. DOI: 10.3390/vaccines10091452.

STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 215–222, 2012. DOI: 10.1128/CMR.05028-11.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F.. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.

TANG, F. H. F., STAQUICINI, F. I., TEIXEIRA, A. A. R., MICHALOSKI, J. S., NAMIYAMA, G. M., TANIWAKI, N. N., SETUBAL, J. C., DA SILVA, A. M., SIDMAN, R. L., PASQUALINI, R., ARAP, W., & GIORDANO, R. J. A ligand motif enables differential vascular targeting of endothelial junctions between brain and retina. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 116, n. 6, p. 2300–2305, 2019. DOI: 10.1073/pnas.1809483116.

TEIXEIRA, A. A. R., CARNERO, L. R., KURAMOTO, A., TANG, F. H. F., GOMES, C. H., PEREIRA, N. B., DE OLIVEIRA, L. C., GARRINI, R., MONTEIRO, J. S., SETUBAL, J. C., SABINO, E. C., PASQUALINI, R., COLLI, W., ARAP, W., ALVES, M. J. M., CUNHA-NETO, E., & GIORDANO, R. J. A refined genome phage display methodology delineates the human antibody response in patients with Chagas disease. **iScience**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 102540, 2021. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102540.

THOMAS, M.; BANKS, L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. **The Journal of General Virology**, [S. l.], v. 80 ( Pt 6), p. 1513–1517, 1999. DOI: 10.1099/0022-1317-80-6-1513.

THOMAS, M.; MASSIMI, P.; NAVARRO, C.; BORG, J. P.; BANKS, L. The hScrib/Dlg apico-basal control complex is differentially targeted by HPV-16 and HPV-18 E6 proteins. **Oncogene**, [S. l.], v. 24, n. 41, p. 6222–6230, 2005. DOI: 10.1038/sj.onc.1208757.

THOMAS, M.; MYERS, M. P.; MASSIMI, P.; GUARNACCIA, C.; BANKS, L. Analysis of Multiple HPV E6 PDZ Interactions Defines Type-Specific PDZ Fingerprints That Predict Oncogenic Potential. **PLoS pathogens**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. e1005766, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005766.

TOGTEMA, M.; HUSSACK, G.; DAYER, G.; TEGHTMEYER, M. R.; RAPHAEL, S.; TANHA, J.; ZEHBE, I. Single-Domain Antibodies Represent Novel Alternatives to Monoclonal Antibodies as Targeting Agents against the Human Papillomavirus 16 E6 Protein. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 9, 2019. DOI: 10.3390/ijms20092088.

TUNGTEAKKHUN, S.S.; DUERKSEN-HUGHES, P.J. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 153, n. 3, p. 397–408, 2008. DOI: 10.1007/s00705-007-0022-5.

VAN ZUNDERT, G. C. P., RODRIGUES, J. P. G. L. M., TRELLET, M., SCHMITZ, C., KASTRITIS, P. L., KARACA, E., MELQUIOND, A. S. J., VAN DIJK, M., DE VRIES, S. J., & BONVIN, A. M. J. J. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 428, n. 4, p. 720–725, 2016. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.09.014.

VERACHI, F.; PERCARIO, Z.; DI BONITO, P.; AFFABRIS, E.; AMICI, C.; ACCARDI, L. Purification and Characterization of Antibodies in Single-Chain Format against the E6 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2018, p. 6583852, 2018. DOI: 10.1155/2018/6583852.

VILLA, L. L., COSTA, R. L., PETTA, C. A., ANDRADE, R. P., AULT, K. A., GIULIANO, A. R., WHEELER, C. M., KOUTSKY, L. A., MALM, C., LEHTINEN, M., SKJELDESTAD, F. E., OLSSON, S. E., STEINWALL, M., BROWN, D. R., KURMAN, R. J., RONNETT, B. M., STOLER, M. H., FERENCZY, A., HARPER, D. M., TAMMS, G. M., ... BARR, E. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **The Lancet. Oncology**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 271–278, 2005. DOI: 10.1016/S1470-2045(05)70101-7.

VILLA, L. L. HPV prophylactic vaccination: The first years and what to expect from now. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 305, n. 2, p. 106–112, 2011. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.12.002.

- VLIEGHE, P.; LISOWSKI, V.; MARTINEZ, J.; KHRESTCHATISKY, M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 15, n. 1–2, p. 40–56, 2010. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.10.009.
- WALLACE, N. A.; KHANAL, S.; ROBINSON, K. L.; WENDEL, S. O.; MESSER, J. J.; GALLOWAY, D. A. High-Risk Alphapapillomavirus Oncogenes Impair the Homologous Recombination Pathway. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 91, n. 20, p. e01084-17, 2017. DOI: 10.1128/JVI.01084-17.
- WANG, Q., GRIFFIN, H., SOUTHERN, S., JACKSON, D., MARTIN, A., MCINTOSH, P., DAVY, C., MASTERSON, P. J., WALKER, P. A., LASKEY, P., OMARY, M. B., & DOORBAR, J. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 78, n. 2, p. 821–833, 2004. DOI: 10.1128/jvi.78.2.821-833.2004.
- WEAVER, B. A. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. **The Journal of the American Osteopathic Association**, [S. l.], v. 106, n. 3 Suppl 1, p. S2-8, 2006.
- WEIJZEN, S.; ZLOBIN, A.; BRAID, M.; MIELE, L.; KAST, W. M. HPV16 E6 and E7 oncoproteins regulate Notch-1 expression and cooperate to induce transformation. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 194, n. 3, p. 356–362, 2003. DOI: 10.1002/jcp.10217.
- WILD, C.P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B.W. **World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention**; International Agency for Research on Cancer. Lyon, França, 2020; Disponível online em: <http://publications.iarc.fr/586>. Acesso em: 14 nov. 2022.
- WINTER, G.; GRIFFITHS, A. D.; HAWKINS, R. E.; HOOGENBOOM, H. R. Making antibodies by phage display technology. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 12, p. 433–455, 1994. DOI: 10.1146/annurev.iy.12.040194.002245.
- WOO, Y. L.; STERLING, J.; DAMAY, I.; COLEMAN, N.; CRAWFORD, R.; VAN DER BURG, S. H.; STANLEY, M. Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. **BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology**, [S. l.], v. 115, n. 13, p. 1616–1621, 2008. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2008.01936.x.
- YEO-TEH, N. S. L.; ITO, Y.; JHA, S. High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 6, 2018. DOI: 10.3390/ijms19061706.
- ZANIER, K., CHARBONNIER, S., SIDI, A. O., MCEWEN, A. G., FERRARIO, M. G., POUSSIN-COURMONTAGNE, P., CURA, V., BRIMER, N., BABAH, K. O., ANSARI, T., MULLER, I., STOTE, R. H., CAVARELLI, J., VANDE POL, S., & TRAVÉ, G. Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 339, n. 6120, p. 694–698, 2013. DOI: 10.1126/science.1229934.
- ZANIER, K.; NOMINÉ, Y.; CHARBONNIER, S.; RUHLMANN, C.; SCHULTZ, P.; SCHWEIZER, J.; TRAVÉ, G.. Formation of well-defined soluble aggregates upon fusion to MBP is a generic property of E6 proteins from various human papillomavirus species. **Protein Expression and Purification**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 59–70, 2007. DOI: 10.1016/j.pep.2006.07.029.
- ZANIER, K.; SIDI, A. M. O.; BOULADE-LADAME, C.; RYBIN, V.; CHAPPELLE, A.; ATKINSON, A.; KIEFFER, B.; TRAVÉ, G. Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. **Structure(London, England:1993)**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 604–617, 2012. DOI: 10.1016/j.str.2012.02.001.

ZANIER, K.; STUTZ, C.; KINTSCHER, S.; REINZ, E.; SEHR, P.; BULKESCHER, J.; HOPPE-SEYLER, K.; TRAVÉ, G.; HOPPE-SEYLER, F. The E6AP binding pocket of the HPV16 E6 oncoprotein provides a docking site for a small inhibitory peptide unrelated to E6AP, indicating druggability of E6. **PloS One**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. e112514, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0112514.

ZERFASS, K.; SCHULZE, A.; SPITKOVSKY, D.; FRIEDMAN, V.; HENGLEIN, B.; JANSEN-DÜRR, P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 69, n. 10, p. 6389–6399, 1995. DOI: 10.1128/JVI.69.10.6389-6399.1995.

ZERFASS-THOME, K.; ZWERSCHKE, W.; MANNHARDT, B.; TINDLE, R.; BOTZ, J. W.; JANSEN-DÜRR, P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. **Oncogene**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 2323–2330, 1996.

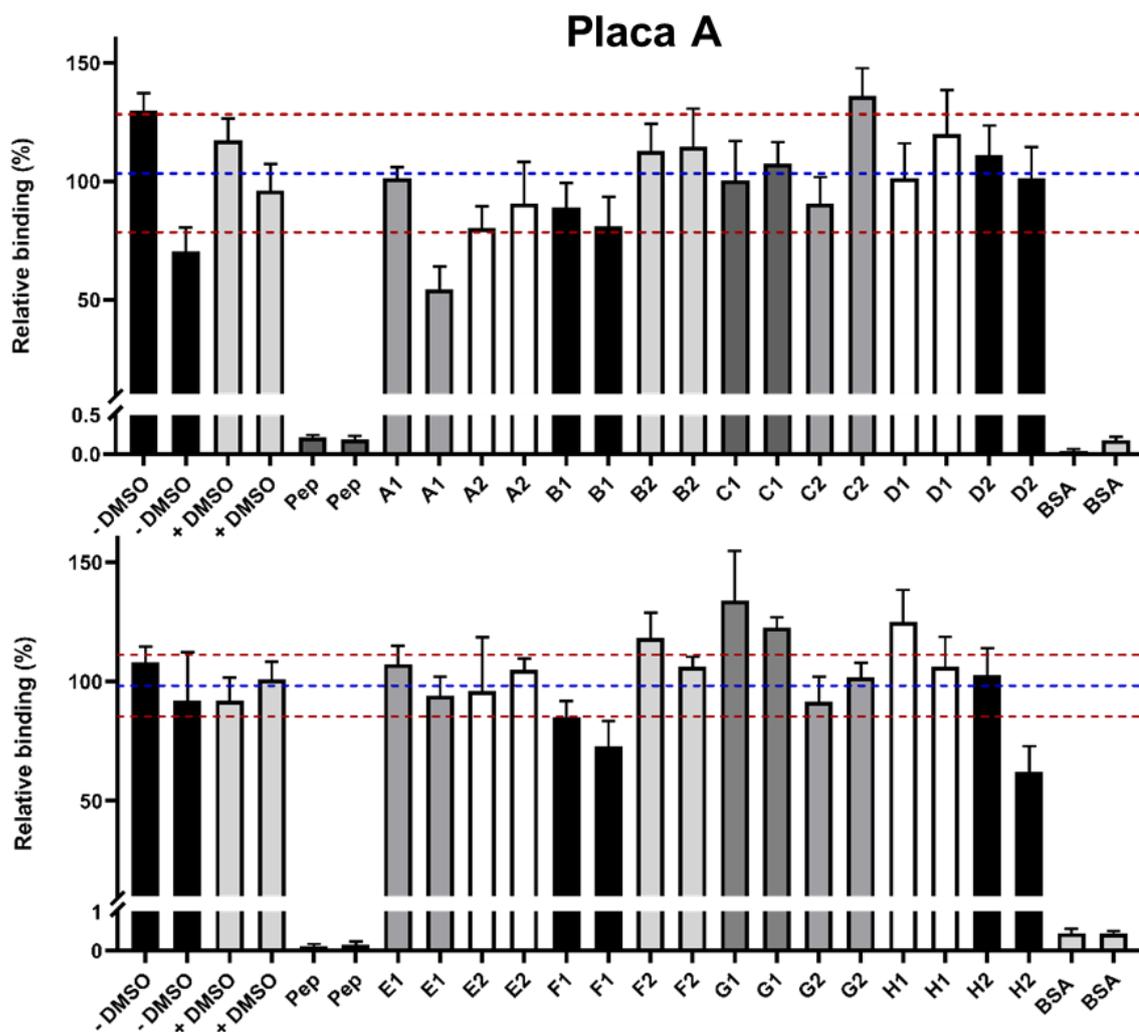
ZHU, J., KAMARA, S., WANG, Q., GUO, Y., LI, Q., WANG, L., CHEN, J., DU, Q., DU, W., CHEN, S., ZHU, S., CHEN, J., CHU, M., & ZHANG, L. Novel Affibody Molecules Targeting the HPV16 E6 Oncoprotein Inhibited the Proliferation of Cervical Cancer Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 9, p. 677867, 2021. DOI: 10.3389/fcell.2021.677867.

ZWERSCHKE, W.; MAZUREK, S.; MASSIMI, P.; BANKS, L.; EIGENBRODT, E.; JANSEN-DÜRR, P. Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 96, n. 4, p. 1291–1296, 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.4.1291.

## APÊNDICE

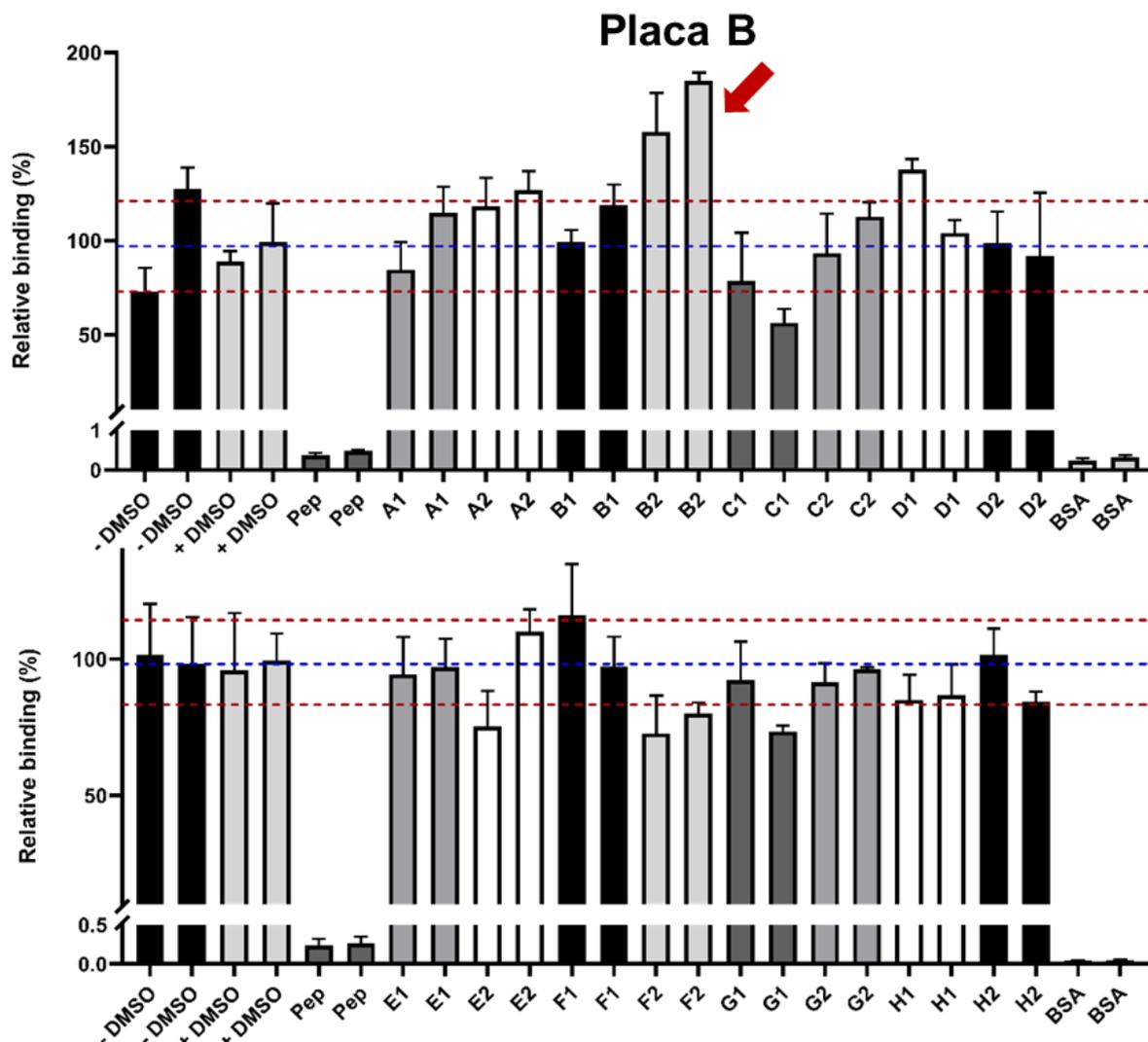
### APÊNDICE A – Análise completa dos ensaios de *Displacement Screening*: varredura do banco de compostos *The Pandemic Response Box*

Figura 47 – Ensaio de competição do fago A2 com pool de compostos da placa A pela ligação à GST-E6.



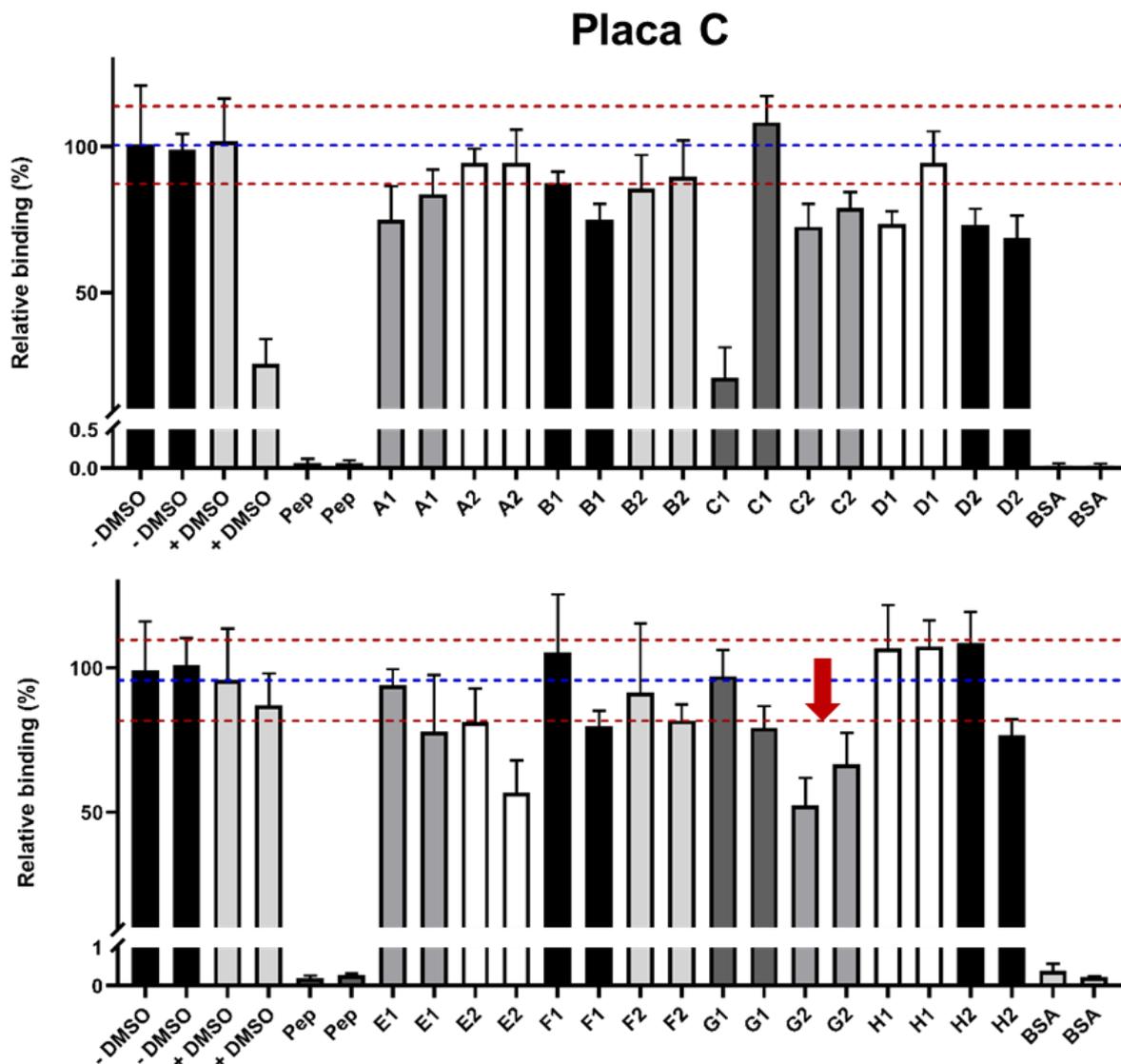
Ensaio de ligação de fagos na ausência ou presença de *pools* compostos do *Pandemic Response Box*. Os valores foram normalizados em relação ao controle sem competição (+ DMSO). A linha azul representa a média do controle e as linhas vermelhas, um desvio-padrão acima ou abaixo da média. As setas vermelhas destacam um *pool* e compostos cujas duplicatas estão abaixo de um desvio-padrão em relação à média dos controles. Pep = 10 $\mu$ M do peptídeo A10.

Figura 48 – Ensaio de competição do fago A2 com pool de compostos da placa B pela ligação à GST-E6.



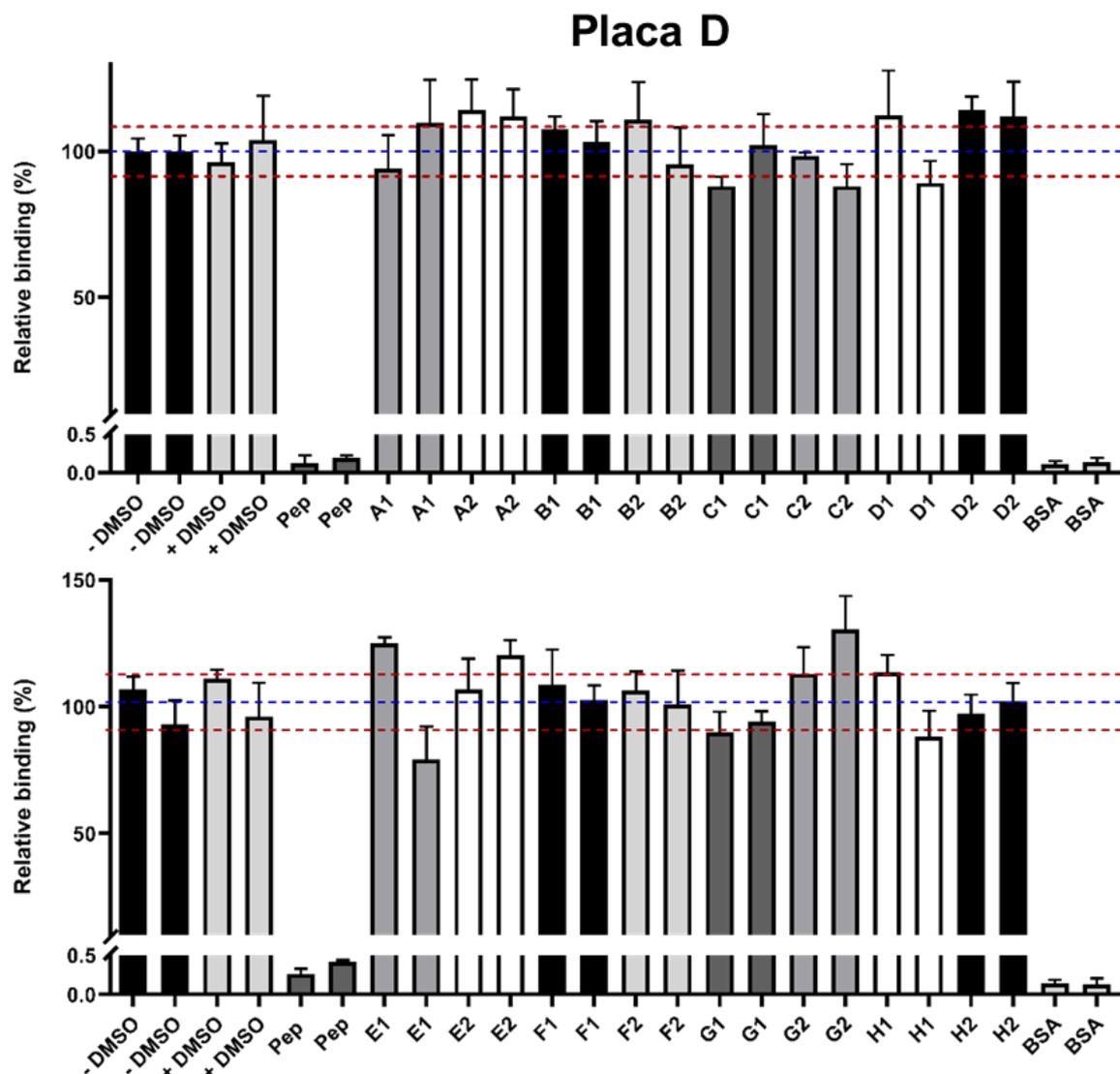
Ensaio de ligação de fagos na ausência ou presença de *pools* compostos do *Pandemic Response Box*. Os valores foram normalizados em relação ao controle sem competição (+ DMSO). A linha azul representa a média do controle e as linhas vermelhas, um desvio-padrão acima ou abaixo da média. As setas vermelhas destacam um *pool* e compostos cujas duplicatas estão abaixo de um desvio-padrão em relação à média dos controles. Pep = 10 $\mu$ M do peptídeo A10.

Figura 49 – Ensaio de competição do fago A2 com pool de compostos da placa C pela ligação à GST-E6.



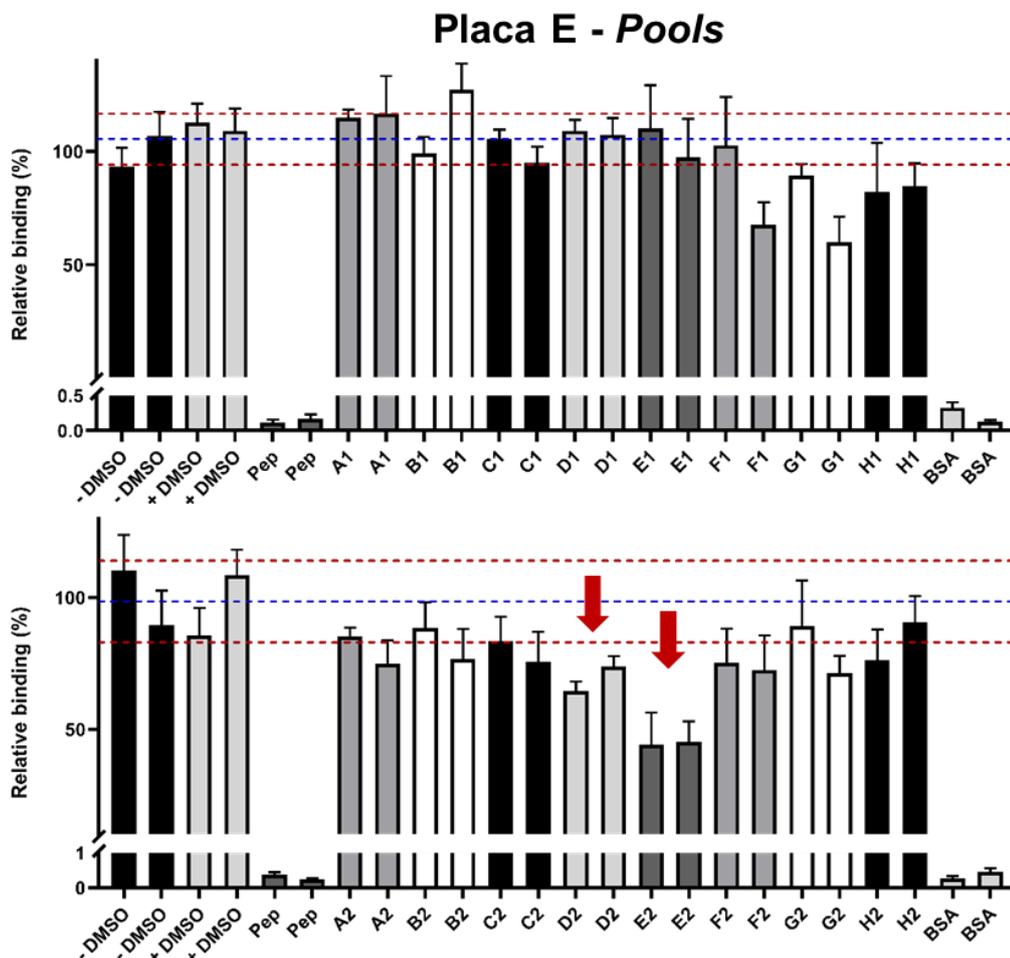
Ensaio de ligação de fagos na ausência ou presença de *pools* compostos do *Pandemic Response Box*. Os valores foram normalizados em relação ao controle sem competição (+ DMSO). A linha azul representa a média do controle e as linhas vermelhas, um desvio-padrão acima ou abaixo da média. As setas vermelhas destacam um *pool* e compostos cujas duplicatas estão abaixo de um desvio-padrão em relação à média dos controles. Pep = 10 $\mu$ M do peptídeo A10.

Figura 50 – Ensaio de competição do fago A2 com pool de compostos da placa D pela ligação à GST-E6.



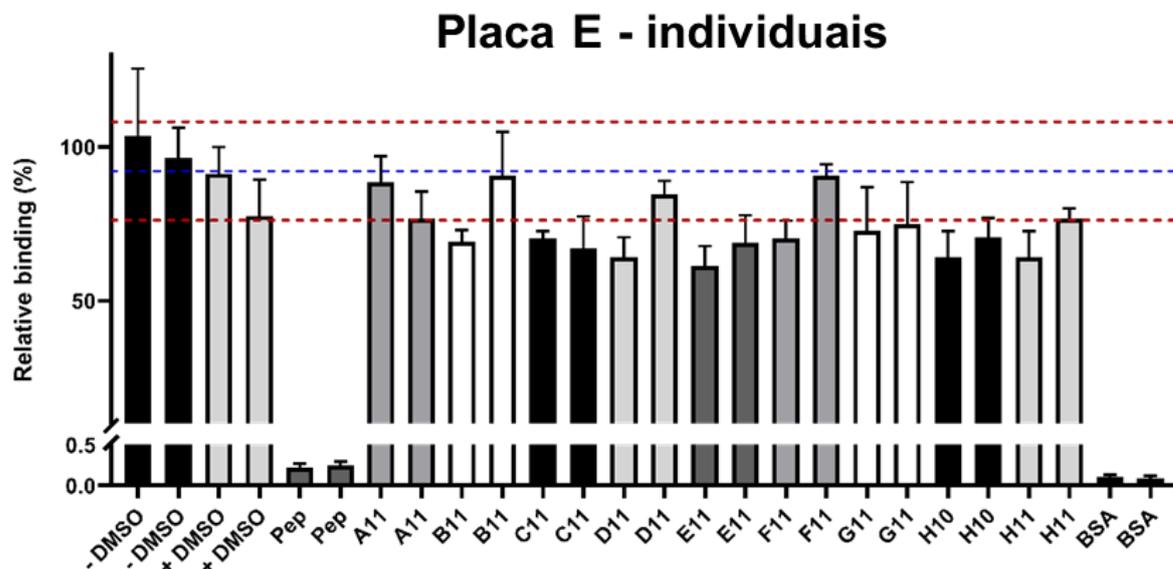
Ensaio de ligação de fagos na ausência ou presença de *pools* compostos do *Pandemic Response Box*. Os valores foram normalizados em relação ao controle sem competição (+ DMSO). A linha azul representa a média do controle e as linhas vermelhas, um desvio-padrão acima ou abaixo da média. As setas vermelhas destacam um *pool* e compostos cujas duplicatas estão abaixo de um desvio-padrão em relação à média dos controles. Pep = 10 $\mu$ M do peptídeo A10.

Figura 51 – Ensaio de competição do fago A2 com pool de compostos da placa E pela ligação à GST-E6.



Ensaio de ligação de fagos na ausência ou presença de *pools* compostos do *Pandemic Response Box*. Os valores foram normalizados em relação ao controle sem competição (+ DMSO). A linha azul representa a média do controle e as linhas vermelhas, um desvio-padrão acima ou abaixo da média. As setas vermelhas destacam um *pool* e compostos cujas duplicatas estão abaixo de um desvio-padrão em relação à média dos controles. Pep = 10 $\mu$ M do peptídeo A10.

Figura 52 – Ensaio de competição do fago A2 com compostos da placa E pela ligação à GST-E6.



Ensaio de ligação de fagos na ausência ou presença de compostos do *Pandemic Response Box*. Os valores foram normalizados em relação ao controle sem competição (+ DMSO). A linha azul representa a média do controle e as linhas vermelhas, um desvio-padrão acima ou abaixo da média. As setas vermelhas destacam um *pool* e compostos cujas duplicatas estão abaixo de um desvio-padrão em relação à média dos controles. Pep = 10 $\mu$ M do peptídeo A10.

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo A** – Súmula Curricular

**Anexo B** – Artigo publicado no periódico “*The Pharmacogenomics Journal*” em dezembro de 2020.

## **ANEXO A - Súmula Curricular**

### **1. DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Heloise Ranucci Luchiari

**Local e data de nascimento:** São Carlos, 01 de julho de 1991.

### **2. EDUCAÇÃO**

- 2017 – 2022            Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil.  
Doutorado em Ciências (Bioquímica).
- 2015 – 2017            Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo,  
Brasil. Mestrado em Ciências (Genética).
- 2010 – 2014            Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
(UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil. Graduação (Bacharelado)  
em Ciências Biomédicas.

### **3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

#### **Cursos**

- 2020            Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. Instituto de  
Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo,  
Brasil.
- 2019            *Technologies, Health and Education*. Faculdade de Odontologia,  
Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 2017            *Cervical Cancer Prevention Course* (online), e-oncologia, Catalan  
Institute of Oncology, ICO, Espanha.
- 2017            “Biologia Molecular da Transformação Maligna, Núcleo de Terapia  
Celular e Molecular (NUCEL), Universidade de São Paulo (USP), São  
Paulo, São Paulo, Brasil.

2016 “*Bioinformatics*, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

### **Participação em eventos**

- 2021 *34th International Papillomavirus Conference*. International Papillomavirus Society. Toronto, Canada.
- 2021 I Simpósio: Desafios em Oncologia Molecular. Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 2020 *33rd International Papillomavirus Conference*. International Papillomavirus Society. Barcelona, Espanha.
- 2019 *II Oncology Symposium*. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 2018 *47th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology*. Joinville, Santa Catarina, Brasil.
- 2017 *3rd ICGEB Workshop on HPV and associated malignancies: biology, prevention and therapy*. Instituto de Radiologia (InRad), São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 2017 *Workshop on Phage Display*. Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

## **4. OCUPAÇÃO**

- 2022 Professora de Ensino Superior, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), Março/2022 – presente.
- 2018 Bolsista de Doutorado, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2017/19801-4. Vigência: Maio/2018 – Setembro/2021.
- 2017 Bolsista de Doutorado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 142168/2017-3. Vigência: junho/2017 – abril/2018.

## 5. PUBLICAÇÕES

### **Artigos completos publicados em periódicos**

LUCHIARI, HELOISE R.; GIORDANO, RICARDO J.; SIDMAN, RICHARD L.; *et al.* Does the RAAS play a role in loss of taste and smell during COVID-19 infections? **The Pharmacogenomics Journal**, v. 21, p. 109-115, 2020.

J.H. MARTINEZ, CRISTHIAM ; VILLAFUERTE, KELLY R.V. ; LUCHIARI, HELOISE R. ; *et al.* Effect of smoking on the DNA methylation pattern of the SOCS1 promoter in epithelial cells from the saliva of patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 90, p. 1279-1286, 2019.

MIRANDA-FURTADO, CRISTIANA L.; LUCHIARI, HELOISE R.; CHIELLI PEDROSO, DAIANA C. *et al.* Skewed X-chromosome inactivation and shorter telomeres associate with idiopathic premature ovarian insufficiency. **Fertility and Sterility**, v. 110, p. 476-485.e1, 2018.

LUCHIARI, HELOISE R.; FERREIRA, CAROLINA S.T. ; GOLIM, MÁRJORIE A. *et al.* Cervicovaginal bacterial count and failure of metronidazole therapy for bacterial vaginosis. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, v. 132, p. 297-301, 2015.

GUERRA, MARINA T.; SILVA, RAQUEL F.; LUCHIARI, HELOISE R.; *et al.* Perinatal Androgenic Exposure and Reproductive Health Effects Female Rat Offspring. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, v. 77, p. 375-389, 2014.

### **Apresentações de Trabalho em Eventos**

LUCHIARI, H. R.; VILLA, L. L.; GIORDANO, R. J. Further studies on a new peptide motif targeting the HPV16 oncoprotein E6. **34th International Papillomavirus Conference**. 2021.

LUCHIARI, HELOISE R.; VILLA, L. L.; GIORDANO, R. J. A new peptide motif targeting HPV16 E6 oncoprotein. **33rd International Papillomavirus Conference**. 2020.

LUCHIARI, H. R.; VILLA, L. L.; GIORDANO, R. J. Peptide ligands for E6 and E7 HPV 16 oncoproteins. **II Oncology Symposium**. 2019.

LUCHIARI, H. R.; VILLA, L. L.; GIORDANO, R. J. Finding peptide ligands to HPV16 oncoproteins E6 and E7 using phage display technology. **47th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology**. 2018.

## 6. OUTROS

### **Palestras ministradas**

LUCHIARI, H. R. Novo motivo peptídico ligante da oncoproteína E6 de HPV16: descoberta e aplicações. 2021. Seminários Gerais do Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO). Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). São Paulo, São Paulo, Brasil.

LUCHIARI, H. R.; “Identificação de peptídeos com potencial inibitório sobre as oncoproteínas E6 e E7 no desenvolvimento de novas terapias para tumores induzidos por HPV”. 2019. Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). São Paulo, São Paulo, Brasil.

LUCHIARI, H.R. Novas abordagens terapêuticas para infecções por HPV. Seminário dos Pós-graduandos e Pós-doutorandos do Departamento de Bioquímica. 2019. Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP), São Paulo, São Paulo, Brasil.

### **Monitoria em disciplinas**

QBQ2457 - Tecnologia do DNA Recombinante. 2019. Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP), São Paulo, São Paulo, Brasil. Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Supervisão: Profa. Dra.. Carla Columbano de Oliveira.

**ANEXO B – Artigo publicado no periódico “*The Pharmacogenomics Journal*” em dezembro de 2020.**



# Does the RAAS play a role in loss of taste and smell during COVID-19 infections?

Heloise R. Luchiari<sup>1</sup> · Ricardo J. Giordano<sup>1</sup> · Richard L. Sidman<sup>2</sup> · Renata Pasqualini<sup>3</sup> · Wadih Arap<sup>4</sup>

Received: 9 July 2020 / Revised: 17 November 2020 / Accepted: 19 November 2020 / Published online: 15 December 2020  
© The Author(s) 2020. This article is published with open access

## Introduction

The new Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) coronavirus, known as SARS-CoV-2, has rapidly spread worldwide. Among its many symptoms, ageusia (loss of taste) and anosmia (loss of smell) are considered as hallmarks of infection [1]. Possible mechanisms for loss of smell and taste in the course of COVID-19 disease are being explored [2, 3] but no direct role of the Renin-Angiotensin-aldosterone system (RAAS) in anosmia and ageusia has been suggested until now. Here we raise a mechanistic hypothesis of unexplored functions of RAAS-associated peptidases in modulating senses of taste and smell and its relationship with chemosensory impairment during COVID-19. This mechanistic perspective has implications for personalized medicine and the pharmacogenomics of COVID-19 management.

## RAAS-associated peptidases as cellular coronavirus receptors in humans

Loss of taste (ageusia) and/or loss of smell (anosmia) have unusually emerged as the most specific symptoms in COVID-19 pandemic outbreak, often being the first or the lone differentiating clinical manifestation of infection by SARS-CoV-2 [1, 4]. During evolution, many coronaviruses have coopted components of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) as viral entry receptors [5]. SARS-CoV, the virus responsible for the global outbreak of SARS in 2003, and SARS-CoV-2, the viral etiology of the current COVID-19 pandemic, both use angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as functional receptor for viral entry [6, 7]. Other coronaviruses such as hCoV-229E, which causes common cold, enter cells via aminopeptidase N (APN or CD13) ref. [8]. ACE2 and APN are both enzymes from RAAS, potentially pointing to this system as a direct contributor for infection and disease progression of coronaviruses in mammals.

The RAAS (Fig. 1) is best known as an endocrine network that regulates arterial blood pressure and fluid balance homeostasis. It acts systemically through angiotensinogen-derived peptides in blood vessels of the heart and kidney. In brief, liver-produced angiotensinogen is converted into the peptide angiotensin-I (AngI) by the peptidase renin, produced by the kidney. AngI is then cleaved by ACE into AngII, which is a potent vasoconstrictor peptide. However, AngII has a truly short life as it is further converted by aminopeptidase A (APA) and aminopeptidase N (APN) into other metabolite peptides with different bioactivities. Besides these well-documented vascular effects, the RAAS is also known to participate in other complex biological phenomena, such as glucose metabolism, kidney homeostasis, and cancer-related angiogenesis [9–11]. ACE2 and APN, the cell-entry receptors for coronaviruses, are in fact membrane-bound peptidases responsible for processing of RAAS-related peptides, indicating a plausible involvement of this system in related symptoms of infection. Although

---

These authors contributed equally: Heloise R. Luchiari, Ricardo J. Giordano

✉ Ricardo J. Giordano  
giordano@iq.usp.br

✉ Wadih Arap  
wadih.arap@rutgers.edu

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup> Department of Neurology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

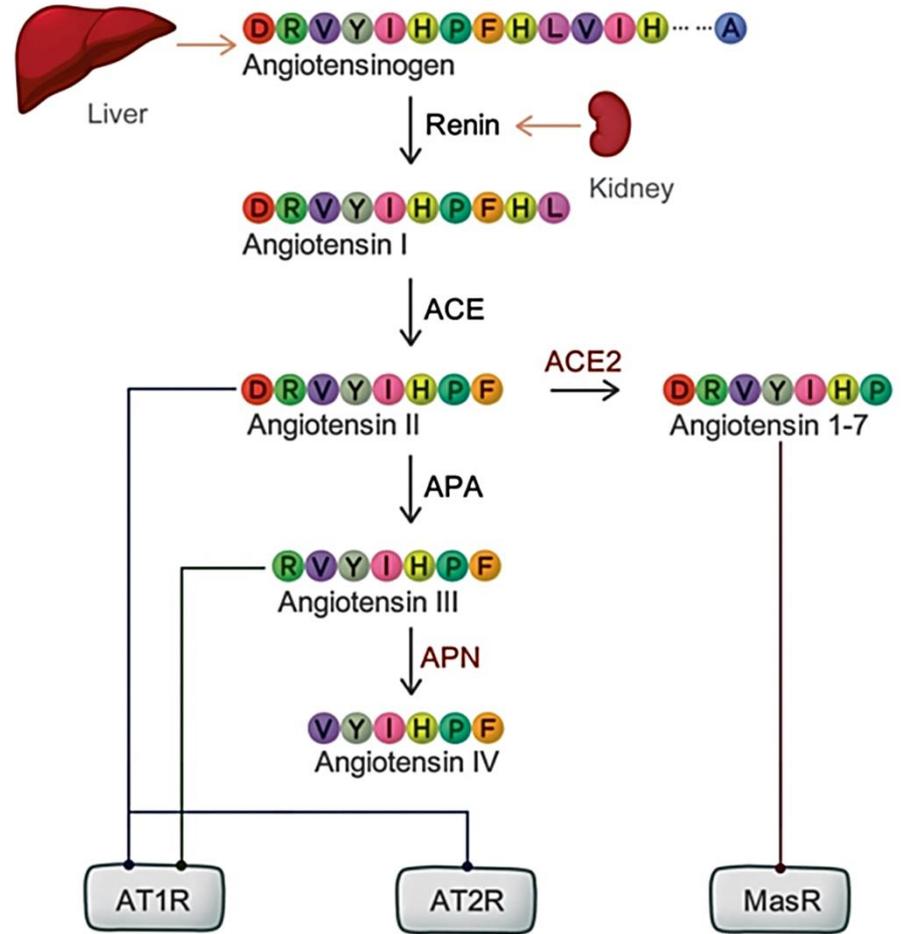
<sup>3</sup> Rutgers Cancer Institute of New Jersey and Division of Cancer Biology, Department of Radiation Oncology, Rutgers New Jersey Medical School, Newark, NJ, USA

<sup>4</sup> Rutgers Cancer Institute of New Jersey and Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine, Rutgers New Jersey Medical School, Newark, NJ, USA

**Fig. 1** The canonical RAAS pathway. Simplified schematic representation of the RAAS.

Light arrows represent secretion, dark arrows represent enzymatic reactions and lines represent bound to receptor.

ACE: Angiotensin II Converting Enzyme, APA: aminopeptidase A, APN: aminopeptidase N, AT1R: Angiotensin II type 1 receptor, AT2R: Angiotensin II type 2 receptor, MasR: Mas receptor.



these proteases have been found in lung, kidney, intestine, and other organs, their expression pattern in sensory tissues in correlation to virus infection is currently under evaluation to determine its potential effects in either oral or nasal epithelium and its role in taste and/or smell impairment during the pathogenesis of viral infection.

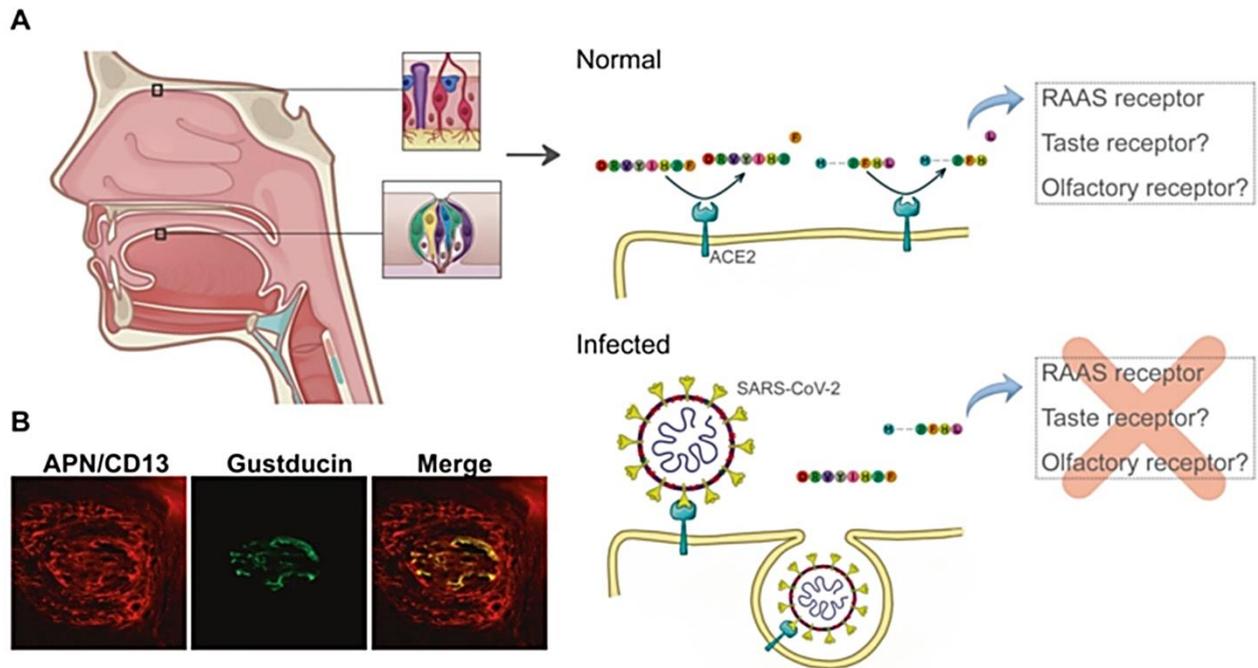
### Taste impairment mediated by SARS-CoV-2 infection: Is there a role for the RAAS?

RAAS components are expressed in taste buds of mice and have been shown to modulate perception of salty and sweet flavors [12, 13]. In fact, ACE2 is found in human epithelial cells of the tongue, and its expression is downregulated by SARS-CoV and SARS-CoV-2 infection [14, 15]. Although less frequently reported, oral chemosensory alterations are also present in hCoV-229E infection via APN receptor, suggesting a role of RAAS dysfunction in viral infection-related ageusia and dysgeusia [16]. Thus, we postulate that RAAS might be involved in loss of taste reported during coronaviruses infection course.

Peptidases regulate metabolism of amino acids and flavor perception in food by releasing specific residues [17].

Distinct amino acids have specific flavors such as glutamate, well known for its umami taste and widespread used in food industry as a flavor additive (under the trade name “AJI-NO-MOTO” or “味の素”, “essence of taste”), and some L-amino acids with aromatic side chains, which trigger bitter taste [18, 19]. ACE2 and APN are, respectively, amino- and carboxypeptidases that promote proteolytic cleavage of proteins and peptides. These RAAS proteases expressed in tongue epithelium may promote activation of taste receptors by releasing residues and thus contributing to taste perception. Once coronaviruses binds to ACE2, they are internalized together into cells, reducing ACE2 availability in the cell membrane [20]. Therefore, ageusia and dysgeusia could perhaps reflect insufficient RAAS peptidase function at membrane due to receptor internalization by coronaviruses infection on taste buds (Fig. 2A). Thus, we reasoned that the proteolytic release of amino acids by RAAS peptidases might be an as yet unappreciated component of taste perception.

Some organs have a functional RAAS pathway, which works cooperatively with systemic RAAS to maintenance of body homeostasis [21]. For instance, local RAAS were reported for kidney, working as a paracrine control of salt



**Fig. 2** Local RAAS impairment leads to loss of taste and smell during COVID-19. **A.** Hypothesis schematic representation: Local RAAS in nasal and oral tissue drives loss of taste and smell after

SARS-CoV-2 infection due to reduced protease activity. **B** Colocalization of APN (CD13) and gustducin. Confocal microscopy image of tongue shows co-localization of APN and gustducin.

absorption in glomerulus, whose damage contribute to the pathophysiology of hypertension and renal injury [22]. This also seems to be the case for flavor-perceiving tissues because all components of the pathway are expressed in taste buds, namely renin, angiotensinogen, angiotensin II type-1 receptor (AT1R), and ACE2 [13]. Notably, exogenous AngII suppresses salt and enhance sweet taste responses in mice through AT1R while pharmacological inhibition of AT1R suppresses the AngII effects on taste cells. This mechanism thereby contributes to reduced intake of salt and sugar, providing evidence of RAAS impact on taste sensitivity and food consumption [12]. Furthermore, a large study of self-reported chemosensory dysfunction during COVID-19 from Global Consortium for Chemosensory Research (GCCR) has recently highlighted salty and sweet flavor perception disturbances among the most reported taste-related impairments in SARS-CoV-2 infection, followed by the others [23]. Altogether, these data corroborate the existence of local RAAS pathway in flavor-perceiving tissues and their possible implication in the genesis of COVID-19 infection-related symptoms.

Sweet and salty taste cells are central for energy intake and electrolytic homeostasis, respectively, and it is reasonable that it might have a rapid and regionalized intake control, managed by a local RAAS. Given that ACE2 receptors are expressed in other cell types, as umami, bitter and sour taste receptors, RAAS may also have unexplored roles in these other taste sensors. Likewise, APN is also expressed in mice tongue, co-localizing with G- $\alpha$ -gustducin

(Fig. 2B), a G-protein associated with taste and gustatory transduction [24]. As coronaviruses hijack the mammalian cell machinery, other molecules involved in taste processing and signal transduction may be impaired in infected cells, leading to the ageusia and dysgeusia as the presenting and hallmark symptom reported by many COVID-19 patients.

As a tantalizing final piece of evidence supporting the involvement of the RAAS in sensory disturbances, either loss or impairment of taste have been self-reported by some patients during use of angiotensin II receptor blockers or ACE inhibitors, in a dose-dependent manner [25–27]. One should note that, in usual clinical settings, those anti-hypertensive drugs are often under the molar concentrations required for effective peptidase inhibition in oral epithelial and in taste cells, which would explain this peculiar side-effect being reported only by some and not by most or all hypertensive patients receiving RAAS-modulating drugs.

### Sniffing out COVID-19: “A rose by any other name would smell as sweet”

Far less is currently known about the role of the RAAS pathway in olfaction but RAAS enzymes are also expressed in murine and human olfactory epithelium [28, 29]. In both species, ACE2 was found in sustentacular cells, primarily associated with structural support, and in stem and perivascular cells [30]. In contrast, olfactory neurons do not seem to express the entry receptor for SARS-CoV-2 [30, 31]. Although a local RAAS has not as yet been

described for olfactory epithelium, the presence of ACE2 in sustentacular cells would arguably favor of a mechanistic role of this system in the processing of odorant molecules. Enzymatic pre-processing of odorants did occur prior to olfactory recognition, as demonstrated to odorants with functional groups (such as aldehydes and esters) that are typically targeted by metabolic enzymes present in mucus. Post-processed metabolites stimulate other odorant receptors and modulate olfactory transmission [32]. Likewise, APN is also expressed and proteolytic active in nasal epithelium [33], directing us to the hypothesis that protease activity of ACE2 and/or APN might be relevant to chemosensory recognition by participating in odorant processing that precedes receptor recognition.

Moreover, sustentacular cells have structural and protective roles on olfactory neurons similar to glial cells in central nervous system. They are tentatively responsible for damage prevention from hazardous molecules to neuronal olfactory cells. In fact, many odorants bound to odorant-binding proteins (OBP) in nasal mucus and are internalized by sustentacular cells, which mediates rapid clearance of molecules from olfactory neurons contact surface [34]. Intercellular communications between sustentacular and neuronal cells also regulate odor perception and their impairment could lead to sense disturbances [35, 36]. The infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in animal model results in loss of cilia in olfactory sensory neurons [31], what likely impairs processing and internalization of odorants as well as intercommunication between these two cell types. Lastly, reduction in odorant-OBP complexes uptake by infected nasal support cells could also trigger odorant receptors desensitization [37], ultimately resulting in anosmia observed in COVID-19 infected patients.

### **SARS-CoV-2 pharmacogenomics and RAAS-related polymorphisms**

Is there a role for genetic background in modulating RAAS in the setting of SARS-CoV-2 infections? If so, how is it connected to COVID-19 symptoms? Although socio-demographic data, age and comorbidities correlate with severity of disease, they are not sufficient to explain the high variability in clinical manifestation, outcomes and mortality rates of SARS-CoV-2 infection. These observations have raised an increasing interest in the role that certain host's genetic backgrounds might play in this scenario [38]. In genomic association studies, two loci were related to morbidity of COVID-19 disease: the *ABO* gene locus, in chromosome 9, and the locus 3p21.31. The *ABO* gene locus was previously known as a source of pharmacogenomic variants correlated to ACE activity; most strikingly, now the exact same genetic locus has been implicated in increased respiratory failure of COVID-19 patients

[39, 40]. Regarding polymorphisms in *ACE2* gene itself, it is known that variants in this genetic locus promote pharmacogenetic modulation of ACE inhibitors response [41] and therefore they have now been under scrutiny as genetic susceptibility loci for COVID-19 outcomes [42]. One should note that the *ACE2* locus is located at chromosome Xp22.2 and that, as an X-linked gene, its genetic polymorphisms will have dominant effects in men and may thereby contribute to clarify the increased prevalence of severe COVID-19 cases in male patients. As X-chromosome inactivations in women are mostly random, they might perhaps exert a protective role in target tissues from most severe forms of COVID-19. The new locus implicated in respiratory failure of new coronaviruses disease, located in the chromosome 3, comprises a Neanderthal-inherited region of human genome and was actually shown to be less frequent in the East Asia population [43]. Consistently, there is also a relevant ethnic difference in the prevalence of taste and smell disturbances as symptoms of COVID-19, which are clinically three times less common in East Asia [44]. Thus, one could speculate that this variance results from the differential genetic prevalence of this specific chromosomal region in 3p21, although such theory still remains to be proven. Lastly, the viral genome may be crucial for infection consequences, since the D614G variant of SARS-CoV-2 (the predominant strain in Europe) predisposes infected individuals to suffer from anosmia [45]. In this sense, genomic variants affecting RAAS gene expression or activity likely influences taste and smell sense impairment, although this hypothesis has not as yet been clinically confirmed. Thus, genetic background is relevant to personalized response to SARS-CoV-2 infections and treatment, and could be responsible for disparities observed in COVID-19 drug-repurposing investigational clinical trials [46, 47]. In sum, these data highlights the urgent need for detailed populational pharmacogenomic studies.

### **Taste, smell in the setting of COVID-19: the current state of the medical science and knowledge gaps**

It is widely accepted that olfactory deficiency influences taste perception through damage in the retronasal olfactory contribution to flavor perception, but one could speculate that both likely occur under a common viral etiology. Data from GCCR report on oral and nasal sensory disturbances sought to minimize olfaction influence in taste report and actually suggested a degree of independence between these factors [23]. Consistently with a transient infective agent, COVID-19-related symptoms seems to last only few weeks, while only long-lasting olfactory disturbances were shown to have influence on taste sense [48].

Self-report of olfaction and gustatory disturbances facilitates populational data acquisition as shown by a

smartphone application to symptoms report of non-hospitalized COVID-19-positive individuals [49]. Despite of the increased reach of internet-based platforms or population survey questionnaires, subjectivity of self-reporting may always lead to underestimation of symptoms prevalence [23]. As a matter of fact, when objective olfactory tests were applied, 98% of patients presented some degree of smell dysfunction against only ~60–80% reported by other subjective approaches [1, 50, 51]. Therefore, the application of objective tests to properly evaluate the extent of ageusia and anosmia in patients with suspected or confirmed SARS-CoV-2 infection is clearly desirable.

The nasal and oral epithelia are the main gateways for respiratory virus infections. As receptors for coronaviruses such as ACE2 and APN are expressed in these sensory tissues, one could surmise that these pathogens indeed gain entry through certain nasal and oral cells and control the intrinsic mammalian cell machinery to produce viral particles, thereby altering the native physiology of chemosensory perception. This logical possibility is evidenced by high viral loads found in nasal cavity—which indicates site-specific viral replication in the anatomical site—that is further confirmed by the use of nasal swabs analysis as diagnostic tools [52]. Even if one cannot entirely rule out the contribution of local inflammation to sensory disturbances, unlike other viral infections, COVID-19 loss of taste and smell is rarely reported along with nasal congestion with no significant alterations in paranasal sinuses by computed tomography [23, 53], directing us to other causes than immunologic alterations in sensitive organs by inflammation.

Animal models for coronaviruses infection have been particularly challenging, since infection in mice does not reliably mimic the clinical features often seen in humans. The emergence of transgenic mice expressing human (h) ACE2 and/or hAPN under species-specific promoters [54–56] may allow an improved understanding of viral pathogenesis. Golden Syrian hamsters were recently used as a trustworthy model to olfactory alterations, resembling partial recovery of olfactory epithelium in 14 days post-infection seen in patients [31]. The establishment of non-human primate animal models for SARS-CoV-2 infection and disease are in progress. These models can resemble respiratory failure and mucosal viral loads found in humans [57–59] and may be useful tools to explore smell and taste impairment, perhaps even more reliable than hACE2 transgenic mice. Considering limitations of each species in experimental design, all may be used to unravel the contribution of RAAS to chemosensory disturbances during coronaviral infection, perhaps in combination with classic food-aversion experimental models.

## Final remarks

Several lines of evidence point to RAAS impairment as a central element in the pathophysiology of anosmia and ageusia during initial presentation of SARS-CoV-2 infection in humans. The juxtaposition of a loco-regional functional RAAS system, with SARS-CoV-2 entry receptor expression in sensory organs, and the side-effects of RAAS inhibitors affecting gustatory senses present an interesting research paradigm to unveil the contribution of this ancient system to the pathogenesis of ageusia and anosmia caused by COVID-19 infection. A well-codified symptom-infection relationship will expedite management and isolation of infected people, particularly in developing countries lacking enough specific test capacity. While most patients seem to fully recover from respiratory COVID-19 infections, it remains too early to tell whether there are permanent effects on the precious human senses of taste and smell. Moreover, The COVID-19 Host Genetics Initiative [60], a joint effort that aim to determine genetic variants involved in response to infection and development of disease, will open a promising path to pharmacogenomic exploration of treatment and symptoms management of SARS-CoV-2 infection. Considering the central influence of RAAS in the pathophysiology of COVID-19 infection, research focused on organ-specific consequences may be helpful to understand the disease course and hopefully lead to insights into the development of effective therapies and vaccines.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** RP and WA are founders of PhageNova Bio. RP is the Chief Scientific Officer and a paid consultant for PhageNova Bio. RP and WA are also founders and stockholders of MBrace Therapeutics and RP serves as a Board Member. These arrangements are managed in accordance with the established institutional conflict of interest policies of Rutgers, The State University of New Jersey. Other authors declare that they have no conflict of interests.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

1. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siati DR, Horoi M, Le Bon SD, Rodríguez A et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00405-020-05965-1>.
2. Cooper KW, Brann DH, Farruggia MC, Bhutani S, Pellegrino R, Tsukahara T, et al. COVID-19 and the chemical senses: supporting players take center stage. *Neuron*. 2020;107:219–33.
3. Butowt R, von Bartheld CS. Anosmia in COVID-19: underlying mechanisms and assessment of an olfactory route to brain infection. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry*. 2020; <https://doi.org/10.1177/1073858420956905>.
4. Giacomelli A, Pezzati L, Conti F, Bernacchia D, Siano M, Oreni L et al. Self-reported olfactory and taste disorders in SARS-CoV-2 patients: a cross-sectional study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa330>.
5. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*. 2020;5:562–9.
6. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003;426:450–4.
7. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579:270–3.
8. Li Z, Tomlinson AC, Wong AH, Zhou D, Desforges M, Talbot PJ et al. The human coronavirus HCoV-229E S-protein structure and receptor binding. *eLife*. 2019; 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.51230>.
9. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med*. 2004;116:263–72.
10. Khakoo AY, Sidman RL, Pasqualini R, Arap W. Does the renin-angiotensin system participate in regulation of human vasculogenesis and angiogenesis? *Cancer Res*. 2008;68:9112–5.
11. Luther JM, Brown NJ. Renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends Pharm Sci*. 2011;32:734–9.
12. Shigemura N, Iwata S, Yasumatsu K, Ohkuri T, Horio N, Sanematsu K, et al. Angiotensin II modulates salty and sweet taste sensitivities. *J Neurosci J Soc Neurosci*. 2013;33:6267–77.
13. Shigemura N, Takai S, Hirose F, Yoshida R, Sanematsu K, Ninomiya Y. Expression of renin-angiotensin system components in the taste organ of mice. *Nutrients*. 2019;11. <https://doi.org/10.3390/nu11092251>.
14. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*. 2020;12. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>.
15. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*. 2005;11:875–9.
16. Suzuki M, Saito K, Min W-P, Vladau C, Toida K, Itoh H, et al. Identification of viruses in patients with postviral olfactory dysfunction. *Laryngoscope*. 2007;117:272–7.
17. Ardö Y. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnol Adv*. 2006;24:238–42.
18. Pal Choudhuri S, Delay RJ, Delay ER. L-Amino acids elicit diverse response patterns in taste sensory cells: a role for multiple receptors. *PLoS ONE*. 2015;10:e0130088.
19. Solms J, Vuataz L, Egli RH. The taste of L- and D-amino acids. *Experientia*. 1965;21:692–4.
20. Wang H, Yang P, Liu K, Guo F, Zhang Y, Zhang G, et al. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Res*. 2008;18:290–301.
21. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006;86:747–803.
22. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharm Rev*. 2007;59:251–87.
23. Parma V, Ohla K, Veldhuizen MG, Niv MY, Kelly CE, Bakke AJ et al. More than smell - COVID-19 is associated with severe impairment of smell, taste, and chemesthesis. *Chem Senses*. 2020 Oct 9;45:609–22. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjaa041>.
24. Yoshida R, Takai S, Sanematsu K, Margolskee RF, Shigemura N, Ninomiya Y. Bitter taste responses of gustducin-positive taste cells in mouse fungiform and circumvallate papillae. *Neuroscience*. 2018;369:29–39.
25. Tsuruoka S, Wakaumi M, Ioka T, Yamamoto H, Ando H, Sugimoto K, et al. Angiotensin II receptor blocker-induces blunted taste sensitivity: comparison of candesartan and valsartan. *Br J Clin Pharm*. 2005;60:204–7.
26. Suliburska J, Duda G, Papek-Musialik D. The influence of hypotensive drugs on the taste sensitivity in patients with primary hypertension. *Acta Pol Pharm*. 2012;69:121–7.
27. Doty RL, Philip S, Reddy K, Kerr K-L. Influences of anti-hypertensive and antihyperlipidemic drugs on the senses of taste and smell: a review. *J Hypertens*. 2003;21:1805–13.
28. Bilinska K, Jakubowska P, Von Bartheld CS, Butowt R. Expression of the SARS-CoV-2 entry proteins, ACE2 and TMPRSS2, in cells of the olfactory epithelium: identification of cell types and trends with age. *ACS Chem Neurosci*. 2020. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00210>.
29. Chen M, Shen W, Rowan NR, Kulaga H, Hillel A, Ramanathan M et al. Elevated ACE-2 expression in the olfactory neuroepithelium: implications for anosmia and upper respiratory SARS-CoV-2 entry and replication. *Eur Respir J*. 2020. <https://doi.org/10.1183/13993003.01948-2020>.
30. Brann DH, Tsukahara T, Weinreb C, Lipovsek M, Berge KV, den, Gong B, et al. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Sci Adv*. 2020;6:eabc5801.
31. Bryche B, St Albin A, Murri S, Lacôte S, Pulido C, Ar Gouilh M et al. Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain Behav Immun*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.06.032>.
32. Nagashima A, Touhara K. Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor perception. *J Neurosci J Soc Neurosci*. 2010;30:16391–8.
33. Agu RU, Obimah DU, Lyzenga WJ, Jorissen M, Massoud E, Verbeke N. Specific aminopeptidases of excised human nasal epithelium and primary culture: a comparison of functional characteristics and gene transcripts expression. *J Pharm Pharm*. 2009;61:599–606.
34. Strotmann J, Breer H. Internalization of odorant-binding proteins into the mouse olfactory epithelium. *Histochem Cell Biol*. 2011;136:357–69.
35. Hegg CC, Irwin M, Lucero MT. Calcium store-mediated signaling in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium. *Glia*. 2009;57:634–44.
36. Dooley R, Mashukova A, Toetter B, Hatt H, Neuhaus EM. Purinergic receptor antagonists inhibit odorant-mediated CREB phosphorylation in sustentacular cells of mouse olfactory epithelium. *BMC Neurosci*. 2011;12:86.
37. Barbour J, Neuhaus EM, Piechura H, Stoepel N, Mashukova A, Brunert D, et al. New insight into stimulus-induced plasticity of the olfactory epithelium in *Mus musculus* by quantitative proteomics. *J Proteome Res*. 2008;7:1594–605.

38. Williams FM, Freydin M, Mangino M, Couvreur S, Visconti A, Bowyer RC et al. Self-reported symptoms of covid-19 including symptoms most predictive of SARS-CoV-2 infection, are heritable. 2020. Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.22.20072124v2>.
39. Chung C-M, Wang R-Y, Chen J-W, Fann CSJ, Leu H-B, Ho H-Y, et al. A genome-wide association study identifies new loci for ACE activity: potential implications for response to ACE inhibitor. *Pharmacogenomics J.* 2010;10:537–44.
40. Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Albillos A, Invernizzi P et al. The ABO blood group locus and a chromosome 3 gene cluster associate with SARS-CoV-2 respiratory failure in an Italian-Spanish genome-wide association analysis. 2020. Preprint at <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.05.31.20114991v1>.
41. Fan X, Wang Y, Sun K, Zhang W, Yang X, Wang S, et al. Polymorphisms of ACE2 gene are associated with essential hypertension and antihypertensive effects of Captopril in women. *Clin Pharm Ther.* 2007;82:187–96.
42. Hou Y, Zhao J, Martin W, Kallianpur A, Chung MK, Jehi L, et al. New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis. *BMC Med.* 2020;18:216.
43. Zeberg H, Pääbo S. The major genetic risk factor for severe COVID-19 is inherited from Neanderthals. *Nature.* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2818-3>.
44. von Bartheld CS, Hagen MM, Butowt R. Prevalence of chemosensory dysfunction in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis reveals significant ethnic differences. *ACS Chem Neurosci.* 2020. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00460>.
45. Butowt R, Bilinska K, Von Bartheld CS. Chemosensory dysfunction in COVID-19: integration of genetic and epidemiological data points to D614G spike protein variant as a contributing factor. *ACS Chem Neurosci.* 2020. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00596>.
46. Takahashi T, Luzum JA, Nicol MR, Jacobson PA. Pharmacogenomics of COVID-19 therapies. *NPJ Genom Med.* 2020;5:35.
47. Zubiaur P, Koller D, Saiz-Rodríguez M, Navares-Gómez M, Abad-Santos F. Important pharmacogenetic information for drugs prescribed during the SARS-CoV-2 infection (COVID-19). *Clin Transl Sci.* 2020. <https://doi.org/10.1111/cts.12866>.
48. Landis BN, Scheibe M, Weber C, Berger R, Brämerson A, Bende M, et al. Chemosensory interaction: acquired olfactory impairment is associated with decreased taste function. *J Neurol.* 2010;257:1303–8.
49. Menni C, Valdes AM, Freidin MB, Sudre CH, Nguyen LH, Drew DA et al. Real-time tracking of self-reported symptoms to predict potential COVID-19. *Nat Med.* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0916-2>.
50. Moein ST, Hashemian SMR, Mansourafshar B, Khorram-Tousi A, Tabarsi P, Doty RL. Smell dysfunction: a biomarker for COVID-19. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2020. <https://doi.org/10.1002/alar.22587>.
51. Yan CH, Faraji F, Prajapati DP, Boone CE, DeConde AS. Association of chemosensory dysfunction and COVID-19 in patients presenting with influenza-like symptoms. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2020. <https://doi.org/10.1002/alar.22579>.
52. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl J Med.* 2020;382:1177–9.
53. Naeini AS, Karimi-Galougahi M, Raad N, Ghorbani J, Taraghi A, Haseli S, et al. Paranasal sinuses computed tomography findings in anosmia of COVID-19. *Am J Otolaryngol.* 2020;41:102636.
54. Jiang R-D, Liu M-Q, Chen Y, Shan C, Zhou Y-W, Shen X-R et al. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2. *Cell.* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.027>.
55. Lassnig C, Sanchez CM, Egerbacher M, Walter I, Majer S, Kolbe T, et al. Development of a transgenic mouse model susceptible to human coronavirus 229E. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:8275–80.
56. Sun S-H, Chen Q, Gu H-J, Yang G, Wang Y-X, Huang X-Y et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.020>.
57. Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, van Doremalen N, Pérez-Pérez L, Schulz J, et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature.* 2020;585:268–72.
58. Woolsey C, Borisevich V, Prasad AN, Agans KN, Deer DJ, Dobias NS et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19. *Nat Immunol.* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00835-8>.
59. Lu S, Zhao Y, Yu W, Yang Y, Gao J, Wang J, et al. Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5:157.
60. COVID-19 Host Genetics Initiative. The COVID-19 Host Genetics Initiative, a global initiative to elucidate the role of host genetic factors in susceptibility and severity of the SARS-CoV-2 virus pandemic. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2020;28:715–8.