

Modelagem molecular por IA da oncoproteína E6 do vírus HPV-16: Desenvolvimento *in silico* de novos epítomos para diagnóstico e influência de mutações locais na via p53

Beatriz Souza de Oliveira; Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Amazonas;
beatrizsouzaoliveira10@gmail.com;

Micael Davi Lima de Oliveira; Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas;

Letícia Fernanda da Silva Martins; Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas;

Vitória Helena Oliveira Castro Silva; Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas;

Jhenyffer Gabrielly do Nascimento Assunção; Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas;

Jaqueline Marques da Silva; Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas;

Toni Ricardo Martins; Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas;
Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), Instituto de Ciências Biológicas (ICB),
Universidade Federal do Amazonas;

1. Introdução

O câncer de colo de útero, uma neoplasia maligna cujo principal fator etiológico é a infecção persistente por tipos oncogênicos do Papilomavírus Humano (HPV), continua a ser um desafio global de saúde pública, afetando desproporcionalmente populações em cenários de vulnerabilidade socioeconômica ¹⁻³. Embora seja uma doença majoritariamente prevenível, a Organização Mundial da Saúde encontra barreiras significativas para sua eliminação. Um exemplo emblemático é a situação epidemiológica de Manaus, Amazonas, que, apesar da disponibilidade de vacinação e rastreamento, sustenta uma das mais elevadas taxas de incidência do mundo conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) de 2023. Este cenário aponta para a necessidade de estratégias mais eficazes e adaptadas, incluindo o monitoramento de mutações virais locais ¹⁻³.

Estudos genômicos recentes em nossa região Amazônica identificaram mutações específicas do HPV-16 com um perfil mutacional distinto nos oncogenes E6 e E7. Mutações como L90V em E6 e N29S em E7 são altamente prevalentes, mas seu impacto estrutural e funcional permanece desconhecido ⁴. A ausência de modelos tridimensionais para estas mutações representa uma lacuna crítica que limita o desenvolvimento de diagnósticos de precisão e imunoterapias direcionadas ⁴.

Diante disso, nosso trabalho propõe a aplicação de inteligência artificial e bioinformática estrutural para preencher essa lacuna. Utilizando o AlphaFold, realizaremos a modelagem *in silico* da oncoproteína E6 com e sem mutações. Em seguida, empregaremos técnicas de docking molecular e dinâmica molecular para elucidar suas interações com alvos celulares chave, como a proteína supressora de tumor p53. Por fim, conduziremos a predição

de epítomos antigênicos como um passo inicial para o desenho *in silico* para diagnósticos de HPV-16.

2. Material e Métodos

2.1. Modelagem Estrutural de Oncoproteínas e Complexos de Referência

As sequências de aminoácidos de referência (wild-type) para as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 foram extraídas do genoma de referência depositado na plataforma NCBI (GenBank ID: NC_001526). As sequências foram então modificadas *in silico* para introduzir as mutações de sentido trocado (missense) de interesse, previamente identificadas em pacientes do estado do Amazonas, no Brasil e no mundo.

A predição da estrutura tridimensional das proteínas, tanto na forma wild-type quanto mutante, foi realizada utilizando o AlphaFold server (<https://alphafoldserver.com/>)⁵, um algoritmo de *deep learning* de alta precisão. A qualidade dos modelos gerados foi rigorosamente avaliada por dois métodos complementares: Análise de Confiança Interna, utilizando do escore pLDDT (predicted Local Distance Difference Test) gerado pelo próprio AlphaFold, que estima a confiabilidade da predição por resíduo; Validação Geométrica Externa, onde houve a submissão dos modelos à plataforma MolProbity para análise da qualidade stereoquímica, incluindo ângulos da cadeia principal (Mapa de Ramachandran) e contatos estéreis.

Para fins comparativos e de validação dos modos de interação, foram empregadas estruturas resolvidas experimentalmente e depositadas no Protein Data Bank (PDB). Isso incluiu o complexo p53-E6-Ubiquitina (PDB ID: 4XR8)⁶. A metodologia pode ser resumida conforme a Figura 1.

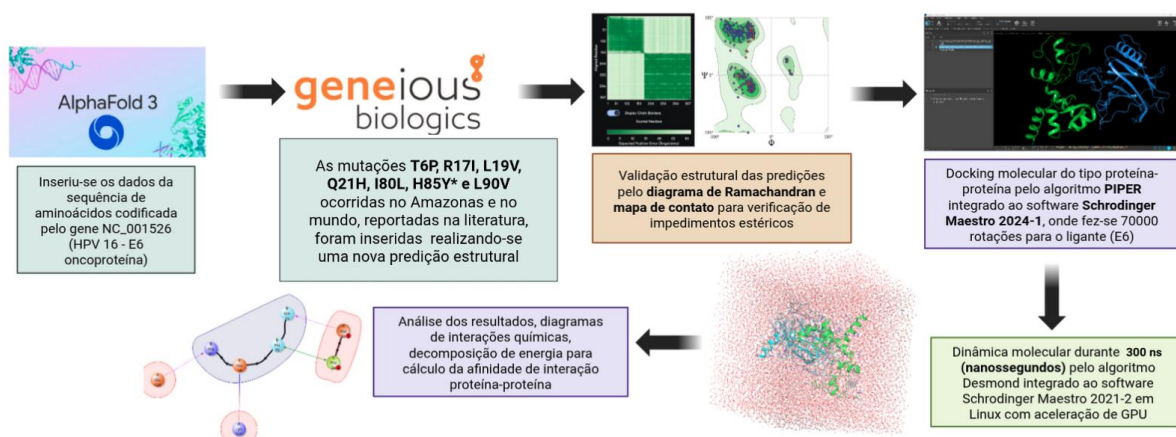


Figura 1. Diagrama da metodologia computacional empregada.

2.2. Predição e Modelagem de Epítomos Antigênicos

A predição de epítomos antigênicos foi conduzida para as proteínas estruturais (L1/L2) e não estruturais (E6/E7), utilizando as sequências do HPV-16. Empregou-se o servidor Immune Epitope Database (IEDB) para identificar epítomos de linfócitos T, utilizando suas ferramentas baseadas em redes neurais artificiais. As predições de ligação ao Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I (MHC-I) foram realizadas para um painel de alelos HLA.

Os peptídeos com maior afinidade de ligação prevista (epítomos candidatos) foram modelados tridimensionalmente com o AlphaFold. Subsequentemente, a imunogenicidade potencial desses epítomos foi investigada por meio de docking molecular com receptores imunes relevantes, como o Receptor de Células T (TCR) e MHC-1.

2.3. Docking Molecular Proteína-Proteína

Para avaliar o impacto das mutações na afinidade de interação, bem como a ligação dos epítomos preditos, foram realizadas simulações de docking proteína-proteína. Realizou-se o docking na ferramenta PIPER integrada ao software Schrodinger Maestro 2021-2 em sistema operacional Linux. A afinidade de interação foi quantificada em termos de energia livre de ligação (ΔG , em kcal/mol).

2.4. Simulações de Dinâmica Molecular para Análise de Estabilidade

Os complexos proteicos de maior interesse obtidos na etapa de docking foram submetidos a simulações de dinâmica molecular (DM) para avaliar sua estabilidade conformacional em um ambiente aquoso. Utilizou-se o Desmond ⁷, módulo do pacote Schrödinger Maestro 2022-1 com campo de força OPLS4. Em relação ao hardware as simulações foram aceleradas por GPU (NVIDIA RTX 3050) em ambiente Linux (Ubuntu 24.10). Dentre os parâmetros da simulação optou-se por um ensemble NPT (número de partículas, pressão e temperatura constantes), nas condições de Temperatura de 300 K (controlada pelo termostato de Langevin) e pressão de 1 atm (controlada pelo barostato de Nosé-Hoover). Quanto ao solvente, utilizou-se o modelo de água explícito TIP3P em uma caixa de solvatação cúbica. A duração das simulações foi de 300 nanossegundos (ns) para cada sistema, o que confere uma boa amostragem de dados para uma análise consistente.

3. Resultados e Discussão

Este estudo demonstrou que as mutações encontradas na oncoproteína E6 do HPV-16, previamente identificadas em pacientes do estado do Amazonas, enfraquecem significativamente sua interação com a proteína supressora de tumor p53 em comparação ao wild-type (Figura 2). Essa conclusão é sustentada por uma perda drástica de contatos moleculares: enquanto a forma não mutada do complexo se estabiliza com 10 (dez) ligações de hidrogênio, a forma com as mutações mantém apenas 5 (cinco) (Figura 3).

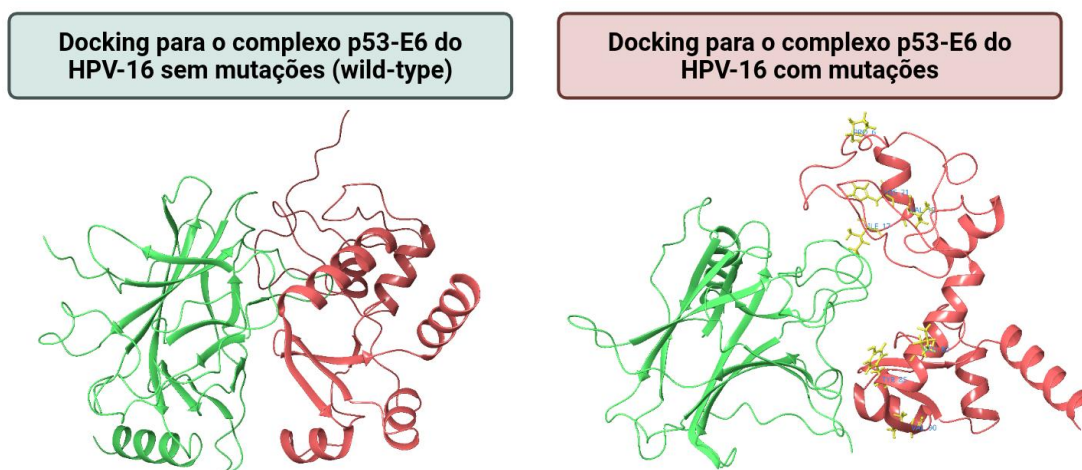


Figura 2. Estrutura tridimensional da interação p53-E6 obtida a partir do docking molecular e das predições de IA no AlphaFold3 comparando a forma mutante com a selvagem.

Essa instabilidade estrutural tem uma consequência energética importante. O valor de decomposição de energia aumentou de -51.91 kcal/mol no complexo padrão para -39.10 kcal/mol no complexo com as mutações, indicando uma menor afinidade de ligação. Uma interação E6-p53 mais fraca pode implicar em uma menor eficiência na inativação da p53, um mecanismo central da carcinogênese cervical (Figura 3).

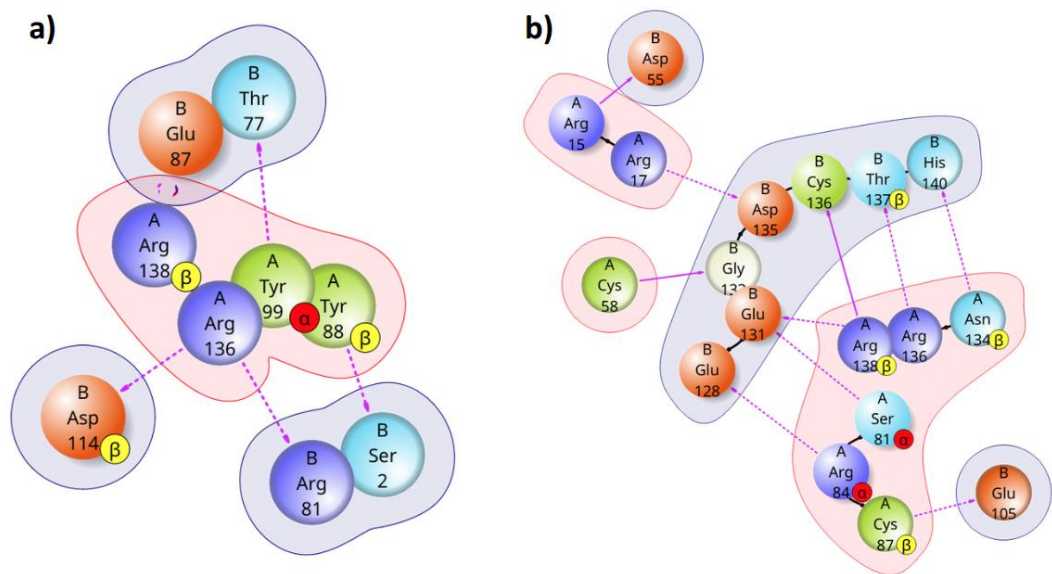


Figura 3. Em a) temos o diagrama de interações quando a proteína viral do HPV-16 E6 apresenta mutações, sendo a Cadeia A a oncoproteína E6 e a Cadeia B a proteína p53. Em b) tem-se a forma ausente de mutações.

Na predição de epítomos antigênicos (Tabela 1), destaca-se o segmento RAHYNIVTF da oncoproteína E7 e o segmento TIHDIILECV da oncoproteína E6 dentre os de maior probabilidade preditos na plataforma IEDB que podem induzir uma imunogenicidade para receptores de células-T e complexos de histocompatibilidade MHC-1.

Tabela 1. Predição da sequência dos epítomos preditos para os antígenos do vírus HPV-16.

Sequência do epítopo	Antígeno
RAHYNIVTF	Oncoproteína E7
YMLDLQPETT	Oncoproteína E7
LLMGTLGIV	Oncoproteína E7
TLGIVCPI	Oncoproteína E7
TIHDIILECV	Oncoproteína E6
KLPQLCTEL	Oncoproteína E6
FAFRDLCIV	Oncoproteína E6
EVYDFAFRDL	Oncoproteína E6

4. Conclusões preliminares

As mutações endêmicas do HPV-16, tanto no Amazonas, no Brasil e no mundo comprometem a integridade estrutural do complexo E6-p53. A perda de metade das ligações de hidrogênio estabilizadoras resulta em uma diminuição mensurável da afinidade de ligação, o que sugere uma potencial atenuação da capacidade da oncoproteína E6 de sequestrar e mediar a degradação de p53. Dessa forma, os resultados fornecem uma base molecular para a hipótese de que pacientes infectados com esta variante possam apresentar desfechos clínicos distintos. Embora estes dados *in silico* forneçam uma forte hipótese para gravidade da doença, são necessários estudos *in vitro* em cultura de células e clínicos para validar o impacto dessas alterações moleculares no prognóstico da infecção cervical na população do Amazonas.

Palavras-Chave: HPV-16; oncoproteína E6; bioinformática; inteligência artificial; epítomos antigênicos.

Divulgação

O (s) autor (es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação deste resumo, por meio eletrônico.

Referências

1. Torres KL, Mariño JM, Pires Rocha DA, de Mello MB, de Melo Farah HH, Reis RS, et al. Self-sampling coupled to the detection of HPV 16 and 18 E6 protein: a promising option for detection of cervical malignancies in remote areas. *PLoS One*. 2018;13(7):e0201262.
2. Torres KL, Rondon HHMF, Martins TR, Martins S, Ribeiro A, Raiol T, et al. Moving towards a strategy to accelerate cervical cancer elimination in a high-burden city—lessons learned from the Amazon city of Manaus, Brazil. *PLoS One*. 2021;16(10):e0258539.
3. Rondon HHMF. Variantes e mutações do HPV 16 e o perfil clínico e histopatológico de mulheres amazônicas com câncer de colo do útero [Tese de doutorado]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2024.
4. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health*. 2020;8(2):e191–203.
5. Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024;630:493–500.
6. Guan J, Bywaters S, Brendle S, Ashley R, Makhov J, Conway J, et al. High-resolution structure analysis of antibody v5 and u4 conformational epitopes on human papillomavirus 16. *Viruses*. 2017;9(12):374.
7. Schrödinger, LLC. Schrödinger Release 2022-2: Desmond Molecular Dynamics System. New York: Schrödinger, LLC; 2022.