

DESENHO *IN SILICO* DE VACINAS PEPTÍDICAS BASEADAS EM FATORES DE PLURIPOTÊNCIA ASSOCIADOS AO MELANOMA METASTÁTICO

IN SILICO DESIGN OF PEPTIDE VACCINES BASED ON PLURIPOTENCY FACTORS ASSOCIATED WITH METASTATIC MELANOMA

DISEÑO *IN SILICO* DE VACUNAS PEPTÍDICAS BASADAS EN FACTORES DE PLURIPOTENCIA ASOCIADOS AL MELANOMA METASTÁSICO

Tatiane Batista dos Santos

Universidade Tiradentes | Aracaju, Sergipe, Brasil
ORCID: 0000-0002-5807-4614

Marianne Celestino Andrade

Universidade Tiradentes | Aracaju, Sergipe, Brasil
ORCID: 0009-0005-4069-040X

Kelisson Alves Sousa

Universidade Tiradentes | Aracaju, Sergipe, Brasil
ORCID: 0009-0002-0705-5517

Enzo Henrike Bitencourt de Moraes

Universidade Tiradentes | Aracaju, Sergipe, Brasil
ORCID: 0009-0001-2245-7947

Victória Garcia Peres

Universidade Tiradentes | Aracaju, Sergipe, Brasil
ORCID: 0009-0009-9492-7360

Pedro Henrique da Silva Rodrigues

Universidade Tiradentes | Aracaju, Sergipe, Brasil
ORCID: 0009-0005-5492-713X



978-65-84528-60-4



10.53524/lit.edt.978-65-84528-60-4/11

Submissão 07/01/26

Publicação 12/01/26

Como citar

SANTOS, T. B. *et al.* Desenho *in silico* de vacinas peptídicas baseadas em fatores de pluripotência associados ao melanoma metastático. *In*: FONTES, F. L. L.; SILVA, J. S. (Org). **Ciência, Tecnologia, Inovação e Saberes Aplicados à Saúde**. Teresina: Literacia Científica Editora & Cursos, 2025, p. 110-119.

RESUMO

OBJETIVO: Realizar um desenho vacinal *in silico* para identificação de potenciais alvos proteicos relacionados à inibição de pontos de controle imunológico no contexto do melanoma metastático (MT). **MATERIAIS E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo *in silico*; utilizaram-se ferramentas de bioinformática para análises de alergenicidade, antigenicidade, propriedades físico-químicas e toxicidade, visando selecionar alvos moleculares adequados para o desenvolvimento de vacinas antitumorais. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Sete genes associados à carcinogênese do MT foram inicialmente identificados, dos quais quatro foram selecionados para etapas subsequentes, permitindo o mapeamento de 42 epítopos imunodominantes. Esses epítopos foram submetidos a triagem virtual para caracterização físico-química, imunogenicidade, toxicidade e antigenicidade, resultando na seleção de dois candidatos prioritários, avaliados por estudos de docking molecular com o receptor TLR-7, que evidenciaram interações por ligações hidrofóbicas e de hidrogênio, indicativas apenas de afinidade estrutural teórica. **CONSIDERAÇÕES FINAIS:** Os achados, baseados exclusivamente em previsões computacionais, sugerem que o mapeamento molecular *in silico* pode auxiliar na identificação de candidatos vacinais contra o melanoma metastático, embora sejam necessárias validações experimentais para confirmar sua relevância imunológica. **PALAVRAS-CHAVE:** Bioinformática, câncer de pele, imunoterapia, melanoma, vacina.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To perform an *in silico* vaccine design to identify potential protein targets related to the inhibition of immune checkpoints in metastatic melanoma (MT). **MATERIALS AND METHODS:** This is an *in silico* study; bioinformatics tools were used for allergenicity, antigenicity, physicochemical property, and toxicity analyses to select suitable molecular targets for antitumor vaccine development. **RESULTS AND DISCUSSION:** Seven genes associated with MT carcinogenesis were initially identified, of which four were selected for further analyses, leading to the mapping of 42 immunodominant epitopes. These epitopes underwent virtual screening for physicochemical characterization, immunogenicity, toxicity, and antigenicity, resulting in two priority candidates that were evaluated by molecular docking with the TLR-7 receptor, showing hydrophobic and hydrogen-bond interactions indicative only of theoretical structural affinity. **FINAL CONSIDERATIONS:** These findings, derived exclusively from computational predictions, suggest that *in silico* molecular mapping may support the identification of vaccine candidates against metastatic melanoma, but experimental validation is required to confirm their immunological relevance.

KEYWORDS: Bioinformatics, skin cancer, immunotherapy, melanoma, vaccine.

RESUMEN

OBJETIVO: Realizar un diseño de vacuna *in silico* para identificar potenciales dianas proteicas relacionadas con la inhibición de puntos de control inmunes en el contexto del melanoma metastático (MT). **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se trata de un estudio *in silico*; se utilizaron herramientas bioinformáticas para analizar alergenicidad, antigenicidad, propiedades fisicoquímicas y toxicidad, con el objetivo de seleccionar dianas moleculares adecuadas para el desarrollo de vacunas antitumorales. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN:** Inicialmente se identificaron siete genes asociados con la carcinogénesis del MT, de los cuales cuatro fueron seleccionados para las etapas posteriores, lo que permitió mapear 42 epítopos inmunodominantes. Estos epítopos fueron sometidos a un cribado virtual para su caracterización fisicoquímica, inmunogenicidad, toxicidad y antigenicidad, resultando en dos candidatos prioritarios que se evaluaron mediante estudios de acoplamiento molecular con el receptor TLR-7, mostrando interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno indicativos sólo de afinidad estructural teórica. **CONSIDERACIONES FINALES:** Los hallazgos, basados exclusivamente en predicciones computacionales, sugieren que el mapeo molecular *in silico* puede contribuir a identificar candidatos vacunales contra el melanoma metastático, aunque se requiere validación experimental para confirmar su relevancia inmunológica. **PALABRAS CLAVE:** Bioinformática, cáncer de piel, inmunoterapia, melanoma, vacuna.

1. INTRODUÇÃO

O melanoma metastático (MT) representa a forma mais agressiva e letal dos cânceres de pele, respondendo por uma pequena proporção dos casos, porém pela maioria dos óbitos relacionados às neoplasias cutâneas (LI *et al.*, 2017; WALDMAN *et al.*, 2019; KOZAR *et al.*, 2019; CASADONTE *et al.*, 2021; HEKLER *et al.*, 2019). Apesar de sua incidência relativamente baixa em comparação aos demais cânceres de pele, o MT apresenta comportamento altamente invasivo e grande potencial metastático, o que o torna um problema clínico prioritário em oncologia cutânea (LI *et al.*, 2017; WALDMAN *et al.*, 2019; KOZAR *et al.*, 2019).

Do ponto de vista biológico, o MT se origina a partir da transformação maligna de melanócitos, podendo envolver características de células embrionárias e de células-tronco tumorais (RYAN *et al.*, 2021; JENKINS; FISHER, 2021). A maioria dos melanomas está associada a mutações espontâneas em genes supressores de tumor, como *TP53* e *PTEN*, que regulam vias de apoptose mediadas por proteínas como *Bcl-2* e *AKT* (ULLAH *et al.*, 2021). Além disso, genes marcadores de pluripotência associados a células-tronco, incluindo *OCT4*, *SOX2* e *NANOG*, têm sido correlacionados a maior invasividade, capacidade metastática e pior prognóstico em MT (MARTENS, 2017; TASDOGAN *et al.*, 2020; RYAN *et al.*, 2021; JENKINS; FISHER, 2021).

Em relação às terapias atualmente disponíveis, a cirurgia permanece como tratamento convencional de escolha, frequentemente associada à radioterapia e quimioterapia, dependendo do estágio da doença (MARTENS, 2017; COPLEY-MERRIMAN *et al.*, 2018). Terapias alvo-dirigidas com Vemurafenib e Dabrafenib, que inibem vias de sinalização com mutações presentes em cerca de 50% dos casos de MT, bem como imunoterapias com inibidores de checkpoints imunes, representaram avanços importantes, mas ainda são limitadas por resistência tumoral, toxicidades e recaídas (MARTENS, 2017; COPLEY-MERRIMAN *et al.*, 2018; WALDMAN *et al.*, 2019). Esse cenário evidencia a necessidade de novas estratégias terapêuticas que ampliem o controle da doença e potencialmente induzam respostas imunes mais duradouras (BAXEVANIS *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2022).

Nesse contexto, vacinas antitumorais têm ganhado destaque como abordagem complementar para diferentes tipos de câncer, incluindo neoplasias associadas ao Papilomavírus Humano (HPV) e câncer de mama, nas quais respostas imunes específicas contra antígenos tumorais mostraram benefício clínico em determinados cenários (BAXEVANIS *et al.*, 2020; BOILESEN; NIELSEN; HOLST, 2021; ZHANG *et al.*, 2022).

Os fatores de pluripotência *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* emergem como candidatos interessantes nesse contexto, uma vez que sua expressão aberrante em células tumorais está associada à manutenção de fenótipos de célula-tronco, resistência terapêutica e maior plasticidade tumoral em melanomas (MARTENS, 2017; TASDOGAN *et al.*, 2020).

No entanto, o uso desses fatores como alvos vacinais demanda análise crítica, pois tratam-se de moléculas com função fisiológica em contextos embrionários e, em alguns casos, em nichos de renovação tecidual, o que pode implicar risco teórico de autoimunidade ou de tolerância imunológica (MARTENS, 2017; TASDOGAN *et al.*, 2020; ULLAH *et al.*, 2021).

Apesar da crescente evidência sobre o papel de *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* na biologia do MT, ainda é limitada a caracterização sistemática de epítomos específicos desses fatores com potencial para uso em vacinas peptídicas contra o melanoma metastático (MARTENS, 2017; TASDOGAN *et al.*, 2020). Também são escassos os estudos que integram, de forma estruturada, análises *in silico* de antigenicidade, alergenicidade, toxicidade, propriedades físico-químicas e interação com componentes da imunidade inata e adaptativa para subsidiar o desenho racional de candidatos vacinais dirigidos a esses alvos (BAXEVANIS *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2022).

Diante dessa lacuna, o presente estudo *in silico* tem como objetivo prospectar epítomos derivados dos fatores transcricionais *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* associados ao MT, avaliando seu potencial vacinal a partir de parâmetros imunológicos e de segurança teórica, com vistas a subsidiar futuras alternativas experimentais em imunoterapia antitumoral (MARTENS, 2017; TASDOGAN *et al.*, 2020; BAXEVANIS *et al.*, 2020).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo *in silico*, de natureza exploratória, baseado em dados secundários de bancos públicos e em análises computacionais de bioinformática para predição e caracterização de epítomos com potencial vacinal no contexto do melanoma metastático.

2.1. DESENHO VACINAL E SELEÇÃO GÊNICA

Inicialmente, foram identificados genes associados à agressividade tumoral e ao potencial metastático do melanoma metastático por meio da plataforma *DisGeNET* (www.disgenet.org), utilizando as palavras-chave "*Metastatic Melanoma*", "*OCT4*", "*SOX2*" e "*NANOG*". Como critérios de inclusão, foram considerados: (i) genes com evidência de associação à fisiopatologia do melanoma/metástase em humanos, (ii) presença de isoformas proteicas bem anotadas no *GenPept* e (iii) envolvimento funcional descrito na literatura com pluripotência, células-tronco tumorais ou resistência terapêutica; foram excluídos genes sem sequência proteica completa, com anotação incompleta ou cuja associação ao melanoma se restringisse a evidências indiretas. Reconhece-se como limitação que não foi realizada, nesta versão do estudo,

uma análise sistemática de expressão diferencial em bases como *TCGA* ou *GTEX*, o que pode ser incorporado em etapas futuras para refinar a priorização de alvos.

2.2. IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES E PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS

As sequências das proteínas e de suas principais isoformas referentes aos genes selecionados foram obtidas na base GenPept (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Com base na estrutura primária das proteínas, procedeu-se à predição do potencial alergênico pelo AlgPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/index.html>), adotando-se limiar $> -0,4$ para classificação como não alergênica, e $> 4,0$ do potencial antigênico pelo VaxiJen v2.0 (<http://www.ddgpharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), considerando-se o score de antigenicidade como parâmetro comparativo para priorização de candidatas.

2.3. PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS T CD8+ E LIMITAÇÕES

O *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) (<http://www.iedb.org>) foi utilizado para a predição de epítopos de células T CD8+ derivados das proteínas *OCT4*, *SOX-2* e *NANOG*. A ferramenta "*MHC I Binding*", com o método "*IEDB Recommended 2020.09 (NetMHCpan EL 4.1)*", foi aplicada para selecionar epítopos com *percentile rank* ≤ 1 , considerados de alta afinidade de ligação ao MHC-I, com predições realizadas para os alelos HLA-A01:01, HLA-A02:01, HLA-A03:01, HLA-A11:01, HLA-A24:02, HLA-A31:01 e HLA-A*33:03, frequentemente descritos em estudos populacionais globais. A análise foi restrita a epítopos de 10 aminoácidos de comprimento e concentrou-se exclusivamente em MHC-I, o que representa uma limitação do estudo, uma vez que epítopos apresentados por MHC-II (células T CD4+) e a respectiva cobertura populacional HLA não foram avaliados, aspectos reconhecidamente relevantes para a plausibilidade imunológica e para estratégias vacinais de uso amplo.

2.4. CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DOS EPÍTOPOS IMUNODOMINANTES

Os epítopos com melhor desempenho em ligação ao MHC-I foram submetidos à ferramenta de predição de imunogenicidade para complexos peptídeo-MHC-I (pMHC-I) disponível no IEDB (CALIS *et al.*, 2013), mantendo-se as configurações padrão e selecionando-se apenas aqueles com valores de score positivos. Em seguida, os epítopos selecionados foram avaliados quanto à toxicidade pelo servidor ToxinPred (GUPTA *et al.*, 2013), à antigenicidade pelo VaxiJen 2.0 e à alergenicidade pelo AllerTOP v2.1, ambos adequados para peptídeos curtos, além de caracterização físico-química no ProtParam (ponto isoelétrico (pI), índice de instabilidade (II) e índice alifático (IA) e GRAVY).

2.5. DOCKING MOLECULAR COM TLR-7

Os peptídeos priorizados foram utilizados em simulações de *docking* molecular no GalaxyPepDock (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=PEPDOCK>), empregando como alvo o receptor Toll-like 7 (TLR-7), cuja estrutura 5GMG foi obtida no Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). O ligante originalmente co-cristalizado foi removido no *Discovery Studio*, que também foi utilizado para visualizar e analisar interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre os peptídeos e o receptor.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vacinologia reversa tem sido aplicada tanto no desenvolvimento de vacinas profiláticas contra patógenos quanto no desenho de vacinas terapêuticas para diferentes neoplasias, incluindo o MT, integrando ferramentas de predição de epítopos, análise estrutural e avaliação *in silico* de segurança e imunogenicidade (CHI; DUDEK, 2011; VINAY *et al.*, 2015; VASQUEZ; TENESACA; BERRAONDO, 2017; AWASTHI; SHARMA; AGRAWAL, 2022).

Nesse contexto, pipelines computacionais que combinam avaliação antigênica, predição de ligação a MHC e filtros de toxicidade/alergenicidade vêm sendo propostos como etapa inicial para priorização de candidatas vacinais, em consonância com recomendações metodológicas em vacinologia baseada em epítopos (BRAZ *et al.*, 2014; LUGOWSKA; TETERYCZ; RUTKOWSKI, 2018).

3.1. IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE MELANOMA METASTÁTICO

A plataforma *DisGeNET* foi utilizada como ponto de partida para identificar genes associados à fisiopatologia do MT e ao potencial metastático, permitindo a seleção de marcadores com relevância biológica e anotação genômica consistente para posterior exploração vacinal (PIÑERO *et al.*, 2017; PIÑERO *et al.*, 2021).

A busca com os descritores "*Metastatic Melanoma*", "*OCT4*", "*SOX2*" e "*NANOG*" resultou na identificação de sete genes com isoformas proteicas distintas, que foram então avaliados quanto à sua plausibilidade como alvos em função de seu envolvimento em pluripotência, manutenção de fenótipos de célula-tronco tumoral e agressividade de MT, conforme sintetizado na Tabela 1.

Tabela 1. Alvos moleculares identificados através da exploração de dados genético na plataforma *DisGeNET* associados ao potencial metastático de MT.

GENE	ID/GenPept	PROTEINA	SEQUÊNCIA
<i>POU domain, class 5, transcription factor 1 isoform</i>	NP_001272916.1	1	MHFYRLFLGATRRLNPEWKGEIDNWCVVYVLTSLLPFKIQSQDI KALQKELEQFALLKQKRITLGYTQADVGLTLGVLFQKVFVSTT ICRFEALQLSFKNMCKLRPLLQKWVEEADNENLQEICKAETL VQARKRKRRTSIENRVRGNLENLFLQCPKPTLQQISHIAQQLGLE KDVVRVWFCNRRQKGRSSSDYAQREDFEAGSPFSGGPPVFSF PLAPGPHFGTPGYGSPHFTALYSSVPFPEGEAFPPVSVTTLGSP PMHSN
<i>POU domain, class 5, transcription factor 1 isoform 4</i>	NP_001272915.1	2	MCKLRPLLQKWVEEADNENLQEICKAETLVQARKRKRRTSIEN RVRGNLENLFLQCPKPTLQQISHIAQQLGLEKDVVRVWFCNRR QKGRSSSDYAQREDFEAGSPFSGGPPVFSFPLAPGPHFGTPG YGSPHFTALYSSVPFPEGEAFPPVSVTTLGSPMHSN
<i>POU domain, class 5, transcription factor 1 isoform 2</i>	NP_001167002.1	3	MGVLFQKVFVSTTICRFEALQLSFKNMCKLRPLLQKWVEEAD NENLQEICKAETLVQARKRKRRTSIENRVRGNLENLFLQCPKPT LQQISHIAQQLGLEKDVVRVWFCNRRQKGRSSSDYAQREDFE AAGSPFSGGPPVFSFPLAPGPHFGTPGYGSPHFTALYSSVPFPE GEAFPPVSVTTLGSPMHSN
<i>POU domain, class 5, transcription factor 1 isoform 1</i>	NP_002692.2	4	MAGHLASDFAFSPPPGGGGDGGPGGPEPGWVDPRTWLSFGQP PGGPGIGVGVGPGSEVWGIPPPYPFCGGMAYCGPQVGVG LVPQGGLETSSQPEGEAGVGVESNSDASPEPCTVTPGAVKLEK EKLEQNPEESQDIKALQKELEQFALLKQKRITLGYTQADVGLT LGVLFQKVFVSTTICRFEALQLSFKNMCKLRPLLQKWVEEADN NENLQEICKAETLVQARKRKRRTSIENRVRGNLENLFLQCPKPTL QQISHIAQQLGLEKDVVRVWFCN5RRQKGRSSSDYAQREDFE EAGSPFSGGPPVFSF6LAPGPHFGTPGYGSPHFTALYSSVPFPE GEAFPPVSVTTLGSPMHSN
<i>homeobox protein NANOG isoform 1</i>	NP_079141.2	5	MSVDPACQSLPCFEASDCKESSPMPVICGPEENYPSLQMS AEMPHTEVSPLPSSMDLLIQDSDPSSTSPKQKQPTSAEKSV AKKEDKVPVKKQKTRTVFSSTQLCVLNDRFQKQKYLSQLQMQ ELSNILNLSYQVKTWFQNRMKSKRWQKNNWPKNNSNGVT QKASAPTYPSLYSSYHQGLVNPTGNLPMWSNQTWNNSTW SNQTQNIQSWNSHWNSTWCTQSWNNQAWNSPFYNGCEE SLQSCMQFQPNPASDLEAALEAAGEGLNVIQQTTRYFSTPQT MDLFLNYSMNMQPEDV
<i>homeobox protein NANOG isoform 2</i>	NP_001284627.1	6	MSVDPACQSLPCFEASDCKESSPMPVICGPEENYPSLQMS AEMPHTEVSPLPSSMDLLIQDSDPSSTSPKQKQPTSAEKSV AKKEDKVPVKKQKTRTVFSSTQLCVLNDRFQKQKYLSQLQMQ ELSNILNLSYQVKTWFQNRMKSKRWQKNNWPKNNSNGVT QGCLVNPTGNLPMWSNQTWNNSTWSNQTQNIQSWNSHWS NTQTWCTQSWNNQAWNSPFYNGGEESLQSCMQFQPNPAS DLEAALEAAGEGLNVIQQTTRYFSTPQTMDFLFLNYSMNMQPE DV
<i>transcription factor SOX-2</i>	AMM45340.1	7	MYNMMETELKPPGQQTSGGGGGNSTAAAAGGNQKNSPDR VKRPMNAFMVWVSRGQRRKMAQENPKMHNSEISKRLGAEWK LLETETKRPFIDEAKRLRALHMKHEHPDYKYPKRRKTKTLMKKD KYTLPGGLLAPGGNSMASGVGVGAGLGAAGVNRQMDSYAHM NGWSNGSYSMMDQLGYQPQHPGLNAHGAAQMQPMHRYDV SALQYNSMTSSQTYMNGSPTYSMSYSQQGTPGMALGSMGS VVKSEASSPPVVTSSHSRAPCQAGDLRDMISMYPGAEVPE EPAAPSRHLMSQHYQSGPVPGTAINGLPLSHM

Fonte: Autoria própria (2026)

As análises confirmaram a presença de quatro isoformas da proteína *OCT4* (*POU5F1*), reconhecida por seu papel na autorrenovação e manutenção da pluripotência de células-tronco, e cuja expressão aberrante tem sido descrita em contextos neoplásicos (GERRARD *et al.*, 2005; CURRY *et al.*, 2015). Para *NANOG*, foram identificadas duas isoformas (*homeobox protein NANOG isoform 1* e *2*), compatíveis com sua função de fator de transcrição envolvido na pluripotência embrionária e em células tumorais (ALLOUBA *et al.*, 2015), enquanto *SOX-2* foi detectado como *transcription factor SOX-2*, associado à manutenção de características de célula-tronco em múltiplos processos de desenvolvimento e em carcinogênese (ZANGROSSI *et al.*, 2007). Embora a estratégia seja adequada para um rastreio inicial, a ausência de dados

de expressão diferencial provenientes de bases como *TCGA* ou *GTEX* é reconhecida como limitação, pois impediram, nesta etapa, uma análise quantitativa da superexpressão desses alvos em MT em comparação a tecidos normais.

3.2. PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS *OCT4*, *SOX-2* E *NANOG*

As proteínas codificadas por *OCT4*, *SOX-2* e *NANOG* foram inicialmente caracterizadas quanto ao potencial alergênico e antigênico, resultando na seleção das proteínas 2, 3, 5 e 7, que apresentaram perfil antigênico favorável e predição de não alergenicidade (Tabela 1). A partir delas, foram mapeados 42 epítopos candidatos, dos quais 12 apresentaram score positivo de imunogenicidade para MHC-I, todos classificados como atóxicos no *ToxinPred*, indicando um primeiro filtro favorável de segurança *in silico* (GUPTA *et al.*, 2013; CALIS *et al.*, 2013).

A etapa subsequente de triagem refinada mostrou que apenas cinco desses epítopos exibiram antigenicidade compatível com potencial vacinal, e, após a avaliação de alergenicidade, três foram excluídos por serem classificados como prováveis alergênicos, de modo que apenas Pep 1 (SFPLAPGPHF), Pep 35 (FMVWSRGQRR) e Pep 39 (HMNGWSNGSY) permaneceram como candidatos imediatos (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Dados dos alelos selecionados, incluindo ID de identificação, peptídeos identificados, pontuação de imunogenicidade obtida pelo IEDB, parâmetros toxicológicos analisados pelo *ToxinPred*, avaliação de antigenicidade pelo *VaxiJen 2.0* e análise de alergenicidade pelo *AllerTOP*.

Proteína	Alelo	ID	Peptídeo	IEDB	<i>ToxinPred</i>	<i>VaxiJen 2.0</i>	<i>AllerTOP v2.1</i>
2	HLA-A*24:02	Pep 1	SFPLAPGPHF	0,05398	NT*	0,6923	NA*
	HLA-A*01:01	Pep 2	YGSPHFTALY	0,14372	NT*	0,5741	PA*
	HLA-A*24:02	Pep 3	AFPPVSVTTL	-0,04136	NT*	-0,1607	NA*
	HLA-A*03:01	Pep 4	RVWFCNRRQK	0,15562	NT*	-0,9767	PA*
	HLA-A*24:02	Pep 5	SPFSGGPVSF	-0,13473	NT*	0,0010	PA*
	HLA-A*33:03	Pep 6	DVVRVWFCNR	0,3823	NT*	-0,3826	PA*
	HLA-A*24:02	Pep 7	GYGSPHTAL	0,03105	NT*	0,4709	PA*
	HLA-A*31:01	Pep 8	KRSSDYAQR	-0,39781	NT*	0,2085	PA*
3	HLA-A*31:01	Pep 9	KVFSQTTICR	-0,08611	NT*	-0,0359	PA*
	HLA-A*24:02	Pep 10	VFSQTTICRF	0,01536	NT*	-0,0211	NA*
	HLA-A*03:01	Pep 11	HIAQQLGLEK	-0,14642	NT*	0,4459	PA*
	HLA-A*02:01	Pep 12	VLFQKVFVSQT	-0,1948	NT*	-0,2916	PA*
	HLA-A*01:01	Pep 13	SSDYAQREDF	0,07496	NT*	0,3368	PA*
	HLA-A*01:01	Pep 14	ASAPTYPSLY	-0,1208	NT*	0,8131	NA*
	HLA-A*03:01	Pep 15	VLNDRFQRQK	0,05158	NT*	0,3970	NA*
5	HLA-A*24:02	Pep 16	TRYFSTPQTM	-0,09222	NT*	0,1246	PA*
	HLA-A*11:01	Pep 17	TSAEKSVAKK	-0,31177	NT*	0,9929	NA*
	HLA-A*01:01	Pep 18	VTQKASAPTY	-0,32745	NT*	0,7977	PA*
	HLA-A*02:01	Pep 19	YLSLQMQEL	-0,49502	NT*	0,6573	NA*
	HLA-A*01:01	Pep 20	ELSNILNLSY	-0,05352	NT*	1,4310	PA*
	HLA-A*31:01	Pep 21	KVPVKKQKTR	-0,65042	NT*	0,5976	NA*
	HLA-A*01:01	Pep 22	LNDRFQRQKY	-0,11456	NT*	0,4725	NA*
	HLA-A*01:01	Pep 23	PTYPSLYSSY	-0,42402	NT*	0,8305	PA*
	HLA-A*31:01	Pep 24	LCVLNDRFQR	0,09738	NT*	0,8148	PA*
	HLA-A*03:01	Pep 25	KGKQPTSAEK	-0,22377	NT*	0,9402	PA*
	HLA-A*03:01	Pep 26	ILNLSYKQVK	-0,4546	NT*	0,4951	NA*
	HLA-A*11:01	Pep 27	LSNILNLSYK	-0,0375	NT*	1,1875	NA*

7	HLA-A*01:01	Pep 28	PQTMDLFLNY	-0,05624	NT*	0,6071	NA*
	HLA-A*01:01	Pep 29	FSTPQTMDF	-0,22662	NT*	0,7139	PA*
	HLA-A*24:02	Pep 30	RYFSTPQTM	-0,17619	NT*	0,1225	PA*
	HLA-A*24:02	Pep 31	RFQRQKYLST	0,41782	NT*	0,8896	NA*
	HLA-A*01:01	Pep 32	YSMMQDQLGY	-0,4235	NT*	0,1838	PA*
	HLA-A*01:01	Pep 33	HMKEHPDYKY	-0,05679	T*	0,0173	NA*
	HLA-A*03:01	Pep 34	MVWSRGQRRK	0,04629	NT*	0,8384	NA*
	HLA-A*33:03	Pep 35	FMVWSRGQRR	0,08997	NT*	0,6616	NA*
	HLA-A*31:01	Pep 36	AFMVWSRGQR	0,04878	NT*	0,3429	NA*
	HLA-A*01:01	Pep 37	AAQMMPMHRY	0,44566	NT*	0,4414	PA*
	HLA-A*01:01	Pep 38	HRYDVLSALQY	0,13999	NT*	0,2966	PA*
	HLA-A*01:01	Pep 39	HMNGWSNGSY	0,01245	NT*	0,6655	NA*
	HLA-A*02:01	Pep 40	TLMKKDKYTL	0,64584	NT*	0,6882	NA*
	HLA-A*02:01	Pep 41	QLGYPQHPGL	0,07543	NT*	1,1863	NA*
HLA-A*01:01	Pep 42	TKTLMKKDKY	0,68984	NT*	0,6971	NA*	

Legenda: ID identificação; NT* Não tóxico; T* Tóxico; NA* Não Alergênico; PA* Provável Alergênico.

Fonte: Autoria própria (2026).

A análise físico-química revelou pI entre 6,46 e 12,30, com índices de instabilidade que classificaram os epítomos 1 e 39 como estruturalmente estáveis, ao passo que Pep 35 apresentou índice de instabilidade elevado (77,05), levando à sua exclusão.

Considerando ainda o índice alifático e os valores de GRAVY, Pep 1 e Pep 39 foram priorizados como candidatos vacinais (tabela 3), por apresentarem combinação mais favorável de estabilidade e características hidrofílicas/hidrofóbicas, ainda que os baixos valores de termoestabilidade indiquem necessidade de otimização em formulações futuras (GASTEIGER *et al.*, 2003; GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990; HOSSAIN *et al.*, 2021).

Tabela 3. Seleção de peptídeos partir das análises de suas características em relação ao alelo, identificação do epítomo, cadeia peptídica do peptídeo e parâmetros físico-químicos.

Proteína	Alelo	ID	Peptídeo	pI	II	IA	Gravy
2	HLA-A*24:02	Pep 1	SFPLAPGPHF	6.46	37.15	49	0.200
7	HLA-A*33:03	Pep 35	FMVWSRGQRR	12.30	77.05	29	-1.020
	HLA-A*01:01	Pep 39	HMNGWSNGSY	6.74	-8.72	0	-1.290

Legenda: ID identificação pI Ponto isoelétrico; II índice de Instabilidade; IA Índice Alifático.

Fonte: Autoria própria (2026).

Importante salientar que os epítomos descartados ao longo do pipeline, seja por baixa imunogenicidade, provável alergenicidade ou instabilidade físico-química, são explicitamente discutidos como resultados negativos, reforçando a transparência do processo de seleção: embora alguns apresentassem boa afinidade prevista a MHC-I, o perfil global de segurança ou estabilidade não foi considerado adequado para prosseguir para etapas posteriores.

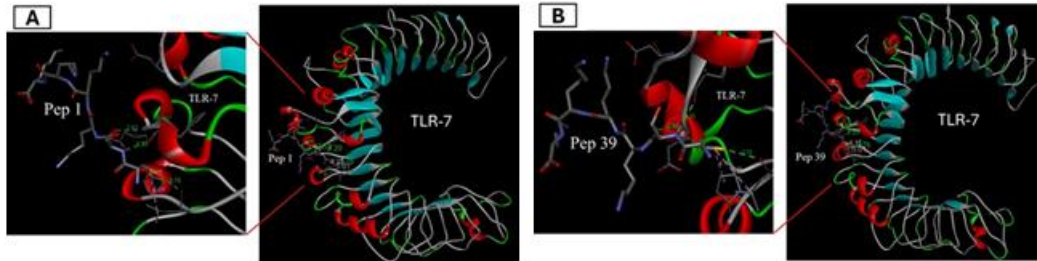
Ademais, a discussão reconhece que a análise foi restrita a MHC-I, sem predição de epítomos MHC-II (CD4+) nem avaliação de cobertura populacional HLA, o que limita os achados e contrasta com recomendações de diretrizes de vacinologia baseadas em epítomos, que mostram a importância de incluir ambos os compartimentos de resposta T e estimar o alcance populacional da vacina.

Entretanto, a predição de epítomos imunodominantes possibilita o desenvolvimento de diversas estratégias vacinais, como vacinas peptídicas, proteicas ou quiméricas. Atualmente, as vacinas baseadas em epítomos, conhecidas como vacinas quiméricas, têm ganhado destaque devido à sua capacidade de amplificar respostas imunes contra alvos específicos (RASHIDIJAHANABAD; HUANG, 2020).

3.3. DOCKING MOLECULAR

No *docking* molecular, Pep 1 e Pep 39 foram acoplados ao TLR-7 utilizando o *GalaxyPepDock*, gerando diversas conformações de interação com a proteína 5GMG (FIGURA 1).

Figura 1: Acoplamento dos peptídeos selecionados com o receptor TLR-7. (A) Epítipo 1 (Pep1) acoplado com o TLR-7. (B) Epítipo 39 (Pep39) acoplado com o TLR-7.



Fonte: Autoria própria (2026).

As análises evidenciaram a presença de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre os epítipos e o receptor, o que sugere possibilidade de afinidade estrutural teórica e estabilidade local do complexo, de acordo com princípios fisicoquímicos descritos para interações proteína-ligante (PINZI; RASTELLI, 2019; DJIKAEV; RUCKENSTEIN, 2011; MERZEL; AVBELJ, 2020).

Destaca-se que o TLR-7 é classicamente um receptor de RNA de fita simples e que modelos de *docking* com peptídeos livres têm caráter essencialmente exploratório, não sendo suficientes para inferir ativação imunológica efetiva nem substituem análises complementares, como dinâmica molecular ou comparação com ligantes conhecidos (WIDMER *et al.*, 2018; PORTER *et al.*, 2019; AGRAWAL *et al.*, 2019).

Assim, os resultados de *docking* são apresentados como indicativos de compatibilidade estrutural, e não como prova de agonismo funcional, sendo reconhecido que alvos mais diretamente relacionados à apresentação antigênica, como complexos MHC-I/peptídeo ou outros Toll-like (TLRs) que reconhecem estruturas proteicas, poderão ser explorados em trabalhos futuros para alinhar melhor o modelo com diretrizes atuais em imunoterapia e vacinologia computacional.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises *in silico* realizadas neste estudo permitiram identificar dois epítipos derivados das proteínas NP_001272915.1 e AMM45340.1, associados a *OCT4* e *SOX-2*, que apresentaram perfil antigênico, predição de não alergenicidade e atoxicidade, além de scores positivos de imunogenicidade e propriedades físico-químicas compatíveis com o uso em estratégias de vacinas peptídicas contra o MT. Esses achados indicam que tais epítipos mostram candidatos teóricos para investigação futura em imunoterapia antitumoral, situando o trabalho no âmbito de um estudo exploratório em vacinologia reversa, sem implicar eficácia clínica evidenciada.

As simulações de *docking* molecular mostraram interações por ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos entre os epítipos selecionados e o TLR-7, sugerindo apenas afinidade estrutural, sem permitir inferências diretas sobre ativação da imunidade inata ou impacto funcional em modelos biológicos. Dessa forma, os resultados devem ser interpretados como hipóteses geradas por modelagem computacional, que necessitam de validação experimental *in vitro* e *in vivo* para confirmar sua relevância imunológica e terapêutica no contexto do melanoma metastático.

Este estudo apresenta limitações importantes, entre as quais se destacam: a natureza exclusivamente *in silico* das análises; a ausência de avaliação de expressão diferencial dos alvos em bancos como *TCGA/GTEX*; a restrição da predição de epítipos ao MHC-I (células T CD8+), sem inclusão de epítipos MHC-II (células T CD4+) nem análise de cobertura populacional HLA; e o caráter exploratório do *docking* com TLR-7, receptor cujo ligante fisiológico clássico é RNA de fita simples. Tais limitações reforçam que os epítipos aqui propostos devem ser entendidos como candidatos preliminares, úteis para orientar etapas subsequentes de pesquisa translacional, e não como intervenções prontas para aplicação clínica.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. *et al.* Benchmarking of different molecular docking methods for protein-peptide docking. *BMC Bioinformatics*, v. 19, 2019.
- ALLOUBA, M. H. *et al.* NaNog: A pluripotency homeobox (master) molecule. *Global Cardiology Science and Practice*, v. 2015, n. 3, 2015.
- AWASTHI, Animesh; SHARMA, Gaurav; AGRAWAL, Piyush. Computational approaches for vaccine designing. In: *Bioinformatics. Academic Press*, p. 317-335, 2022.
- BAXEVANIS, Constantin N. *et al.* Exploring essential issues for improving therapeutic cancer vaccine trial design. *Cancers*, v. 12, n. 10, p. 2908, 2020.
- BOILESEN, Ditte Rahbæk; NIELSEN, Karen Nørgaard; HOLST, Peter Johannes. Novel antigenic targets of HPV therapeutic vaccines. *Vaccines*, v. 9, n. 11, p. 1262, 2021.
- BRAZ, C. C. L. *et al.* Contribuições da biotecnologia no desenvolvimento e produção de vacinas de primeira, segunda e terceira gerações. *Revista saúde & ciência online*, v. 3, n. 3, p. 189–206, 2014.
- CALIS, J. J. A. *et al.* Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity. *PLOS Computational Biology*, v. 9, n. 10, p. e1003266, 2013.
- CASADONTE, R. *et al.* Imaging Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis to Differentiate Melanocytic Nevi and Malignant Melanoma. *Cancers 2021*, v. 13, n. 13, p. 3197, 2021.
- CHI, M.; DUDEK, A. Z. Vaccine therapy for metastatic melanoma: Systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Melanoma Research*, v. 21, n. 3, p. 165–174, 2011.
- COPLEY-MERRIMAN, C. *et al.* Direct costs associated with adverse events of systemic therapies for advanced melanoma: Systematic literature review. *Medicine*, v. 97, n. 31, 2018.
- CURRY, E. L. *et al.* Using induced pluripotent stem cells as a tool for modelling carcinogenesis. *World Journal of Stem Cells*, v. 7, n. 2, p. 461, 2015.
- DJIKAEV, Y. S.; RUCKENSTEIN, E. The variation of the number of hydrogen bonds per water molecule in the vicinity of a hydrophobic surface and its effect on hydrophobic interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 16, n. 4, p. 272–284, 2011.
- GERRARD, L. *et al.* Stably Transfected Human Embryonic Stem Cell Clones Express OCT4-Specific Green Fluorescent Protein and Maintain Self-Renewal and Pluripotency. *Stem cells*, v. 23, n. 1, p. 124–133, 2005.
- GUPTA, S. *et al.* In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *Plos one*, v. 8, n. 9, p. e73957, 2013.
- HEKLER, A. *et al.* Deep learning outperformed 11 pathologists in the classification of histopathological melanoma images. *European Journal of Cancer*, v. 118, p. 91–96, 2019.
- JENKINS, R. W.; FISHER, D. E. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 141, n. 1, p. 23–31, 2021.
- KOZAR, I. *et al.* Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1871, n. 2, p. 313–322, 2019.
- LI, X. *et al.* Comparative efficacy and safety of immune checkpoint inhibitor-related therapies for advanced melanoma: a Bayesian network analysis. *Oncotarget*, v. 8, n. 48, p. 83637, 2017.
- LUGOWSKA, I.; TETERYCZ, P.; RUTKOWSKI, P. Immunotherapy of melanoma. *Contemporary Oncology*, v. 22, n. 1, p. 61, 2018.

MARTENS, Adam Araí. Avaliação dos efeitos de compostos enantioméricos de telúrio sobre a biologia celular de melanomas humanos-ênfoque em morfologia e processos celulares. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2017.

MERZEL, F.; AVBELJ, F. Why do water molecules around small hydrophobic solutes form stronger hydrogen bonds than in the bulk?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1864, n. 4, p. 129537, 2020.

PIÑERO, J. *et al.* DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n.1, p. 833–839, 2017.

PIÑERO, J. *et al.* The DisGeNET cytoscape app: Exploring and visualizing disease genomics data. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 19, p. 2960–2967, 2021.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

PORTER, K. A. *et al.* What method to use for protein–protein docking? *Current Opinion in Structural Biology*, v. 55, p. 1–7, 2019.

RASHIDIJAHANABAD, Zahra; HUANG, Xuefei. Recent advances in tumor associated carbohydrate antigen based chimeric antigen receptor T cells and bispecific antibodies for anti-cancer immunotherapy. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, p. 101390, 2020.

RYAN, J. F. *et al.* Melanoma metastatic to the hyoid bone. *Clinical Case Reports*, v. 9, n. 1, p. 522–525, 2021.

TASDOGAN, A. *et al.* Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential. *Nature*, v. 577, n. 7788, p. 115–120, 2020.

ULLAH, S. *et al.* Do technological innovations have symmetric or asymmetric effects on environmental quality? Evidence from Pakistan. *Journal of Cleaner Production*, v. 316, p. 128239, 2021.

VASQUEZ, M.; TENESACA, S.; BERRAONDO, P. New trends in antitumor vaccines in melanoma. *Annals of Translational Medicine*, v. 5, n. 19, p. 1–6, 2017.

VINAY, D. S. *et al.* Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, v. 35, p. 185–198, 2015.

WALDMAN, R. A. *et al.* Skin diseases of the breast and nipple: Benign and malignant tumors. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 80, n. 6, p. 1467–1481, 2019.

WIDMER, J. *et al.* Polymer-based nanoparticles loaded with a TLR7 ligand to target the lymph node for immunostimulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 535, n. 1–2, p. 444–451, 2018.

ZANGROSSI, S. *et al.* Oct-4 Expression in Adult Human Differentiated Cells Challenges Its Role as a Pure Stem Cell Marker. *Stem cells*, v. 25, n. 7, p. 1675–1680, 2007.

ZHANG, Lianru *et al.* Recent progress on therapeutic vaccines for breast cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 12, p. 905832, 2022.