



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

NATALY AMORIM DE SANTANA

**Influência da Dinâmica Conformacional da E1 Helicase de
Papillomavirus na Interação com Ligantes**

RECIFE

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NATALY AMORIM DE SANTANA

**Influência da Dinâmica Conformacional da E1 Helicase de
Papillomavirus na Interação com Ligantes**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE,
como requisito para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Jose Luiz de Lima Filho

Co-orientador: Roberto Dias Lins

RECIFE
2011

Santana, Nataly Amorim de

Influência da dinâmica conformacional da E1 Helicase de Papillomavírus na interação com ligantes / Nataly Amorim de Santana. – Recife: O Autor, 2011.

86 folhas : il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Co-Orientador: Roberto Dias Lins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

**1. Papillomavirus 2. Câncer de útero 3. Vírus-Genética I.
Título.**

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-128

NATALY AMORIM DE SANTANA

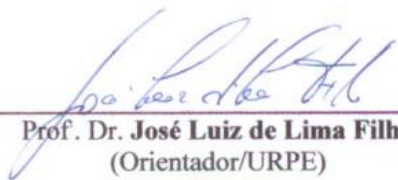
**Influência da Dinâmica Conformacional da E1 Helicase de
Papillomavirus na Interação com Ligantes**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE,
como requisito para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas.

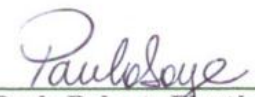
Área de Concentração: Biotecnologia
Orientador: Jose Luiz de Lima Filho
Co-orientador: Roberto Dias Lins

Aprovada em 10 de março de 2011, pela comissão examinadora.

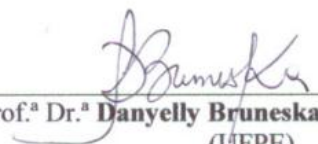
Comissão Examinadora:



Prof. Dr. **José Luiz de Lima Filho**
(Orientador/URPE)



Prof. Dr. **Paulo Roberto Eleutério de Souza**
(UFRPE)



Prof.ª Dr.ª **Danyelly Bruneska Gondim Martins**
(UFPE)

AGRADECIMENTOS

Ao meu co-orientador, Prof. Roberto Dias Lins, pelo acolhimento, orientação, confiança, paciência, compreensão, dedicação e pela impressionante disponibilidade em ajudar os seus alunos. Muitíssimo obrigada pela ajuda!

Ao meu orientador, Profº José Luiz de Lima Filho pela confiança e por ter me conduzido desde a minha iniciação científica.

Aos meus amigos Elaine Virgínia e Gustavo Alves, pelo grande apoio, incentivo, amizade e por sempre acreditarem que NO FINAL TUDO DÁ CERTO!!

À companheira Júlia Campos, por ter suportado o meu estresse, lapsos de memória e chatice destes dois últimos anos e por ter proporcionado preciosos momentos de descontração que ajudaram a relaxar. COMPANHEIRA, DESISTIR JAMAIS!

Aos coordenadores do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE, André Galembeck e Andréa Baltar, pela compreensão.

Aos colegas do Laboratório de Química Teórica e Computacional do Departamento de Química Fundamental – UFPE, pela ajuda.

À Profª Tereza Soares e ao doutorando Fred Pontes pelas preciosas sugestões.

À Adenilda, secretária da Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFPE, pela atenção e paciência.

E por fim, gostaria de agradecer especialmente aos meus pais e ao meu marido. Devo-lhes tudo o que sou e o que tenho e SEM VOCÊS NADA FARIA SENTIDO!

RESUMO

A infecção pelo papillomavirus humano (HPV) é o principal agente causal para o desenvolvimento de câncer de colo uterino que é a segunda causa de morte por câncer em mulheres no mundo e o segundo tipo de câncer mais frequente em mulheres na faixa etária de 15 a 44 anos. Além disso, é cada vez mais frequente a infecção por HPV em diferentes locais do corpo humano ocasionando tanto lesões malignas quanto benignas. Dada à importância clínica na saúde pública mundial desta infecção, têm surgido esforços da comunidade científica a fim de desenvolver fármacos que possam inibir e/ou impedir a infecção desse vírus. Neste sentido, a proteína E1 é uma das proteínas virais que têm sido investigadas como um alvo potencial para o desenvolvimento destes fármacos, já que a mesma é uma DNA helicase que participa do processo de replicação viral. O potencial de derivados do ácido bifenilsulfonacético na inibição da atividade ATPase de E1 foi verificado em estudos anteriores. O derivado nº 9 teve maior eficácia na inibição da atividade ATPase da E1 helicase de HPV6 do que na E1 helicase de HPV11. Como não foi encontrado nenhum outro sítio de ligação além do sítio ATPase na E1 de HPV18, esta diferença de inibição observada entre os HPVs estudados foi atribuída a ligação do derivado nº 9 ao aminoácido Y486 de HPV6 que resulta uma mudança conformacional no sítio ATPase e consequentemente impede a ligação do ATP. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar o docking e a dinâmica molecular a fim de compreender o modo de ligação do derivado nº 9 do ácido bifenilsulfonacético na E1 helicase de HPV, além de determinar a influência dos resíduos de aminoácidos localizados no sítio ATPase na afinidade com o inibidor. Os resultados mostraram que o derivado nº 9 do ácido bifenilsulfonacético e o ATP competem pelo mesmo sítio de ligação e, além disso, as mobilidades observadas no P-loop e nos resíduos de aminoácidos A486, K490, S491 e Y492 do sítio ATPase podem determinar a diferença de afinidade do complexo proteína-inibidor.

Palavras-chave: HPV, E1 helicase, Ácido Bifenilsulfonacético.

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) infection is described as the causative agent for development of cervical cancer and is related to the appearance of benign and malignant lesions in different sites of the human body. Despite of the clinical importance in global public health of this infection, there have been efforts by the scientific community for to develop drugs that can inhibit and/or prevent the virus infection. In this sense, the E1 protein is one of the viral proteins that have been investigated as a potential target for the development of these drugs. The potential inhibitor of the biphenylsulfonacetic acid derivatives on the inhibition of ATPase activity of E1 was observed in previous studies. Compound n° 9 was more effective in inhibiting the ATPase activity of HPV6 E1 helicase than the HPV11 E1 helicase. As there was found no other binding site than the ATPase site in HPV18 E1, this difference in inhibition observed between HPV studied was attributed to binding of compound n°. 9 to the amino acid Y486 HPV6 resulting in a conformational change in the ATPase site and thus prevents the binding of ATP at that site. Thus, the purpose of this study was to use the docking and molecular dynamics to understand the binding mode of the compound n°. 9 in the E1 helicase of HPV, and to determine the influence of amino acid residues located at the site ATPase in the inhibitor affinity. The results of this study showed that the biphenylsulfonacetic acid compound n°. 9 and ATP compete for the same binding site and in HPV18 E1 helicase the flexibility of the P-loop and the conformational rearrangement of A486, K490, S491 and Y492 are critical for coupling ligand binding site on the ATP. Thus, this study will contribute to the design of drugs that inhibit the activity of HPV E1 helicase.

Keywords: HPV, E1 helicase, Biphenylsulfonacetic Acid.

LISTA DE FIGURAS - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Organização do genoma dos papillomavirus.....	13
Figura 2. Árvore filogenética mostrando os 29 gêneros de papillomavirus conhecidos	14
Figura 3. Distribuição dos 10 tipos virais de HPV mais prevalentes no câncer invasivo de colo de útero por continente	15
Figura 4. Direção de translocação do DNA pelas helicases	17
Figura 5. Os sete motivos (I, Ia, II, III, IV, V e VI) conservados nas Superfamílias 1 e 2 das helicases	17
Figura 6. Visualização frontal da estrutura cristalográfica do complexo hexamérico de E1 helicase de BPV1 associada com DNA	18
Figura 7. Sítio de ligação ao ATP de E1 helicase de papillomavirus	19
Figura 8. Interações entre as subunidades monoméricas de E1 helicase de papillomavirus e interação com ATP (lado esquerdo) e ADP (lado direito).....	20
Figura 9. Visão lateral esquerda da estrutura cristalográfica de E1 helicase de BPV – 1 na ausência de DNA e cofatores	21
Figura 10. Organização dos domínios funcionais da proteína E1 helicase.....	22
Figura 11. Representação esquemática da ligação de E1 e E2 ao DNA viral para a formação do complexo hexamérico e separação da dupla fita de DNA.	23
Figura 12. Representação esquemática de um vírion e uma VLP de HPV demonstrando a semelhança estrutural de ambos sem o DNA viral	24
Figura 13. Estrutura química dos nove inibidores potenciais contra a atividade ATPase de E1 helicase dos HPVs 6, 11 e 16.....	25
Figura 14. Parte da sequência de aminoácidos da E1 helicase dos HPVs 6, 11, 16 e 18 e BPV1.....	26
Figura 15. Inibição da atividade ATPase utilizando 10 nM do composto nº 9 para a E1 helicase dos HPVs 11 (WT), os mutantes de HPV11 L461F, C486L, C486Y e K493S e o HPV6	26

LISTA DE FIGURAS - ARTIGO 1

Figura 1. Gráfico de Ramachandran das estruturas tridimensionais da E1 helicase de HPV6 (a), HPV11 (b), HPV16 (c) e HPV18 (d) modeladas a partir do 2GXA (cadeia B).....	42
Figura 2. Conformações de menor energia obtidas no docking molecular.....	43
Figura 3. a) Monômero de E1 helicase de BPV1 do complexo hexamérico 2GXA. b) Monômero de E1 helicase de HPV18 evidenciando os resíduos K66 e Y68 (resíduos equivalentes a K439 e M441 de BPV1) e o P-loop.....	46
Figura 4. Conformações de menor energia dos clusters 1 (a) e 2 (b) do docking molecular do inibidor nº 9 com o BPV1.....	47
Figura 5. B-factor da estrutura cristalográfica de E1 helicase de HPV18 (acima) e flutuação da estrutura modelada de HPV18 (abaixo).....	47
Figura 6 Variação da estrutura secundária da proteína E1 helicase de HPV18 durante a simulação de dinâmica molecular (0-50 ns).....	48
Figura 7 Mapa de contato dos carbonos α dos aminoácidos da E1 helicase de HPV18 no início (0-10 ns) e no final (40-50 ns) da simulação.....	48
Figura 8 Deslocamentos de dos ângulos χ_1 e χ_2 de Y68 durante a simulação de dinâmica molecular	49
Figura 9 Distância entre os resíduos A62 e S67.....	49
Figura 10 . a) Interações entre as cadeias laterais de K66 e S67 durante a dinâmica molecular. b) visualização da formação da ponte de hidrogênio entre K66 e S67 e a ruptura desta ponte de hidrogênio (c).....	50

LISTA DE FIGURAS - ANEXO 2

Figure 1. Schematic representation of possible infection sites of human papillomavirus.....	64
---	----

LISTA DE TABELAS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Tipos de HPVs e sua associação com o risco de desenvolvimento de lesões malignas ou benignas.....	19
---	----

LISTA DE TABELAS – ARTIGO 1

Tabela 1. Tipos de dockings realizados entre a E1 helicase de papillomavirus com os ligantes ADP e o inibidor nº 9.....	51
Tabela 2. Identidade (%) entre as sequências primárias e RMSD (Å) entre as estruturas tridimensionais da E1 helicase dos HPV6, 11 e 16 e a E1 helicase de HPV18 (1TUE).....	51
Tabela 3. Identidade (%) entre as sequências primárias e RMSD (Å) entre as estruturas tridimensionais da E1 helicase dos HPV6, HPV11, HPV16 e HPV18 e a E1 helicase de BPV1 (2GXA – cadeia A).....	52
Tabela 4. Identidade (%) entre as sequências primárias e RMSD (Å) entre as estruturas tridimensionais da E1 helicase dos HPV6, HPV11, HPV16 e HPV18 e a E1 helicase de BPV1 (2GXA – cadeia B).....	52
Tabela 5. Lista dos dockings entre a proteína E1 helicase de PVs e os ligantes ADP e inibidor nº 9.....	52

LISTA DE TABELAS – ANEXO 2

Table 1. List of treatment according to the clinical lesion caused by Human papillomavirus.....	64
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 O Papillomavirus Humano (HPV)	13
2.1 Helicases – Biomotores moleculares	16
2.2 Arquitetura do sítio de ATPase da proteína E1 de Papillomavirus.....	19
2.3 E1 Helicases de Papillomavirus Humano	21
2.4 O Emprego de Ferramentas <i>in silico</i> para o Desenho de Fármacos.....	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
5. ARTIGO 1.....	35
7. CONCLUSÕES	55
8. ANEXOS	56

1. INTRODUÇÃO

Os vírus pertencentes à família *Papillomaviridae* são capazes de infectar o tecido epitelial de vertebrados podendo causar lesões benignas ou malignas. Dos 189 tipos pertencentes à família *Papillomaviridae*, 120 tipos infectam humanos e, desse modo, são denominados de papillomavirus humano (HPV) (Bernard, Burk et al. 2010).

O HPV está associado à ocorrência de lesões benignas e malignas em uma grande variedade de sítios no corpo humano (zur Hausen 2009). A infecção do trato genital feminino pelo HPV é a infecção sexualmente transmitida mais comum, como também, é o principal fator de risco para o surgimento de câncer de colo de útero (Markowitz 2007; Bodily and Laimins 2010).

O câncer de colo de útero é a segunda maior causa de morte por câncer em mulheres no mundo. Aproximadamente 500 mil novos casos de câncer de colo do útero são diagnosticados mundialmente a cada ano e ocasionam cerca de 250.000 óbitos de mulheres por ano, sendo que 80% dessas mortes ocorrem em países subdesenvolvidos (Parkin, Bray et al. 2005; INCA 2006; Jemal, Siegel et al. 2006). No Brasil, o número de casos novos de câncer cervical esperado para o ano de 2010 foi de 18.430, com um risco estimado de 18 casos a cada 100.000 mulheres (INCA 2009).

Dada à relação direta do HPV na etiologia do câncer de colo uterino, tem havido um grande empenho da comunidade científica a fim de desenvolver fármacos que sejam capazes de inibir este vírus. Desse modo, existem disponíveis duas vacinas profiláticas baseadas na produção de *virus-like particles* (VLPs) da proteína do capsídeo viral L1. A grande limitação destas vacinas é conferir proteção a apenas quatro (HPV6, 11, 16 e 18) dos mais de 100 tipos de HPVs existentes atualmente (Shi, Sings et al. 2007; Tristram and Fiander 2007; Keam and Harper 2008).

Assim, a busca por novos fármacos que possam abranger uma proteção a um número maior de tipos virais de HPV têm sido realizada. A proteína E1 é um alvo potencial para o desenvolvimento destes fármacos inibidores, visto que a mesma possui a ORF (*open reading frame* – quadro aberto de leitura) mais bem conservada entre todos os genes e é uma DNA helicase que desempenha um papel fundamental na replicação viral (Phelps, Barnes et al. 1998; Frick 2003; Sterlinko Grm and Banks 2004; White, Faucher et al. 2005).

Em estudo realizado por White, Faucher *et al.*, (2005), o ácido bifenilsulfonacético e seus derivados foram capazes de inibir a atividade ATPase da proteína E1 de HPV6. Esta inibição da atividade ATPase foi atribuída a um único aminoácido de tirosina localizado próximo ao sítio ATPase na posição 486 de HPV6. Contudo, como não foram encontrados nenhum outro potencial sítio de ligação além do sítio ATPase no HPV, acredita-se que a ligação dos componentes inibidores a esta tirosina possa ocasionar uma mudança conformacional no sítio de ligação ao ATP que seja capaz de alterar a afinidade do mesmo.

Desse modo, o presente estudo objetivou por meio de abordagens de modelagem, dinâmica e docking molecular, determinar a influência da dinâmica conformacional da E1 helicase de papillomavirus na interação com ligantes, bem como, predizer a interação do composto nº 9 derivado do ácido bifenilsulfonacético com esta proteína.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Papillomavirus Humano (HPV)

O genoma do HPV é composto por DNA circular fita dupla com cerca de 8Kb e está constituído basicamente por regiões regulatórias e pelas regiões codificantes (Figura 1). A origem de replicação do DNA (ORI viral) e a maioria dos promotores de transcrição estão localizados na região URR (região regulatória *upstream*). A região tardia ou *late* expressa genes que codificam as proteínas estruturais L1 e L2, cujas funções são a viabilização da liberação dos vírions pela formação do capsídeo viral (Favre, Ramoz et al. 1997; Terhune, Hubert et al. 2001). Já a região precoce ou *early*, codifica a maior parte dos genes virais no início do ciclo viral. As proteínas E1 e E2 são proteínas regulatórias da replicação viral e a proteína E4 é responsável pela maturação viral e alteração da matriz intracelular. As proteínas E6 e E7 são classificadas como oncogênicas por estarem envolvidas na transformação maligna das células infectadas pelo HPV (Munger 2004). Em tecidos malignos, as oncoproteínas E6 e E7, são altamente expressas e quando ocorre o bloqueio de sua expressão, o fenótipo de malignidade na célula cancerígena é suprimido (zur Hausen 2000).

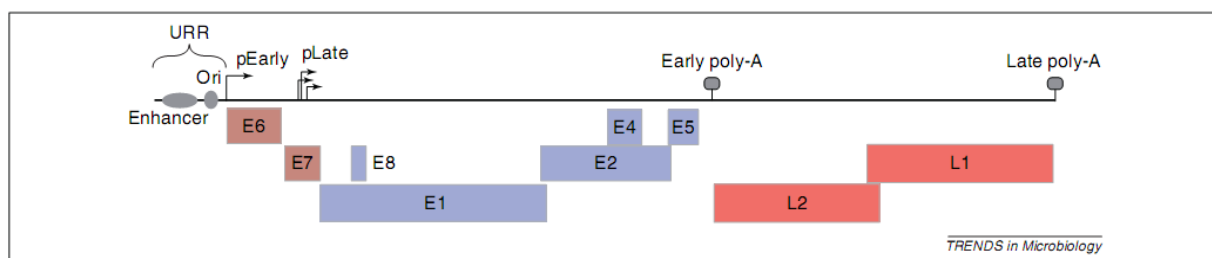


Figura 1. Organização do genoma dos papillomavirus. A origem de replicação viral (ORI) e os elementos regulatórios situam-se na URR (*upstream regulatory region*). Os promotores dos genes *Early* e *Late*, bem como, dos sinais de poliadenilação são regulados durante a diferenciação da célula hospedeira. E6 e E7 modulam a regulação do ciclo celular para garantir a replicação viral. E1, E2, E4, E5 e E8 estão envolvidas na replicação do DNA viral, bem como, no controle da transcrição e outras funções. L1 e L2 são as proteínas do capsídeo (Bodily and Laimins 2010).

A classificação de novos tipos virais de PV é baseada no genoma da proteína L1, uma vez que, esta proteína é bem conservada e pode ser alinhada com todos os PVs conhecidos (de Villiers, Fauquet et al. 2004; Bernard 2005). Assim, o surgimento de um novo tipo viral está condicionado a uma taxa diferencial do gene L1 maior que 10% em relação a outro tipo de papillomavirus conhecido. As diferenças entre o gene L1 de tipos de papillomavirus de 2 a 10% caracterizam subtipos, enquanto que menos de 2% caracterizam uma variante (de Villiers, Fauquet et al. 2004).

câncer de colo uterino, uma vez que, são encontrados em 70,1% dos casos (Castellsagué, Sanjosé et al. 2007). A figura 3 mostra a distribuição dos 10 tipos de HPVs mais prevalentes por continente.

Tabela 1. Tipos de HPVs e sua associação com o risco de desenvolvimento de lesões malignas ou benignas. Modificado de Lacey (2009).

Baixo risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 57, 66
Alto risco	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68

		Any histology			
country/region name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
Africa Continent	1st	16	1940	51.6	(49.4-53.9)
	2nd	18	1940	18.1	(16.4-19.9)
	3rd	45	1940	9.1	(7.8-10.4)
	4th	33	1777	6.2	(5.2-7.5)
	5th	35	1710	4.1	(3.2-5.1)
	6th	52	1820	3.4	(2.6-4.3)
	7th	51	1638	3.1	(2.3-4.1)
	8th	31	1750	2.5	(1.8-3.4)
	9th	58	1820	1.3	(0.8-2.0)
	10th	39	1247	1.1	(0.6-1.9)

		Any histology			
country/region name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
Americas Continent	1st	16	3634	52.4	(50.8-54.0)
	2nd	18	3527	18.3	(17.1-19.7)
	3rd	31	2992	5.2	(4.5-6.1)
	4th	45	2668	4.3	(3.6-5.2)
	5th	33	2947	3.8	(3.1-4.6)
	6th	52	2576	2.1	(1.6-2.7)
	7th	58	2576	1.9	(1.4-2.5)
	8th	35	2767	1.7	(1.3-2.3)
	9th	39	2411	1.2	(0.8-1.7)
	10th	59	2435	1.1	(0.7-1.6)

		Any histology			
country/region name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
Europe Continent	1st	16	6674	57.7	(56.5-58.9)
	2nd	18	6541	16.8	(15.9-17.7)
	3rd	33	6387	4.3	(3.8-4.8)
	4th	31	5625	4.1	(3.6-4.7)
	5th	45	4342	3.5	(3.0-4.1)
	6th	35	4158	1.5	(1.2-2.0)
	7th	52	3939	1.4	(1.0-1.8)
	8th	58	3416	1.1	(0.8-1.6)
	9th	68	2165	1.1	(0.7-1.6)
	10th	39	2778	1	(0.6-1.4)

		Any histology			
country/region name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
Asia Continent	1st	16	10068	53.3	(52.3-54.3)
	2nd	18	9996	15.2	(14.5-15.9)
	3rd	58	8629	8.6	(8.0-9.2)
	4th	33	8737	5.2	(4.8-5.7)
	5th	52	7902	4.9	(4.5-5.4)
	6th	45	6253	3.5	(3.1-4.0)
	7th	31	7591	2.8	(2.4-3.2)
	8th	59	6244	1.8	(1.5-2.2)
	9th	35	6863	1.6	(1.3-1.9)
	10th	39	6001	1.5	(1.2-1.8)

		Any histology			
country/region name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
Oceania Continent	1st	16	625	56	(52.0-59.9)
	2nd	18	625	20.2	(17.1-23.5)
	3rd	45	352	5.4	(3.3-8.3)
	4th	39	302	2.3	(0.9-4.7)
	5th	73	302	2.3	(0.9-4.7)
	6th	35	302	1.7	(0.5-3.8)
	7th	31	405	1.5	(0.5-3.2)
	8th	33	405	1.2	(0.4-2.9)
	9th	52	405	1	(0.3-2.5)
	10th	58	405	0.7	(0.2-2.1)

Figura 3. Distribuição dos 10 tipos virais de HPV mais prevalentes no câncer invasivo de colo de útero por continente. Disponível em: <http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/DataQueryResult.cfm>. Acesso em 17 de março de 2011.

O surgimento de lesões malignas ocasionadas pelo HPV está relacionado à integração viral ao DNA do hospedeiro. Assim, durante o seu ciclo biológico, o HPV, pode ou não integrar-se ao DNA do hospedeiro. Na forma episomal ou não integrada, após o amadurecimento epitelial, o vírus é liberado pela lise celular. Já no processo de integração viral, ocorre à perda parcial (E2 e L2) ou total (E4 e E5) de proteínas regulatórias e estruturais do vírus ocasionando a expressão desregulada das proteínas E6 e E7 e a consequente proliferação celular desordenada (Bodily and Laimins 2010).

As membranas mucosas e o tecido epitelial escamoso estratificado são os sítios preferidos pelo HPV para a infecção, replicação e maturação viral (Brandstetter, Bohmer et al. 2010). Uma vez infectado, o indivíduo poderá se curar espontaneamente ou em casos em que a resposta imune do hospedeiro não seja eficiente, a infecção poderá persistir e originar neoplasias intra-epiteliais que podem progredir para o câncer (Stanley 2009). Desse modo, a consequência clínica da infecção dependerá não somente do tipo de HPV que está envolvido no processo infeccioso, mas também, de condições inerentes do hospedeiro.

2.1 Helicases – Biomotores moleculares

As helicases são enzimas que atuam como biomotores moleculares capazes de catalisar a separação de fitas-duplas de DNA, RNA ou híbridos DNA-RNA à custa de energia livre derivada da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) (Patel and Picha 2000). A energia química proveniente da hidrólise do ATP é convertida em energia mecânica para a separação da fita-dupla. A ligação ao ácido nucléico, ligação e hidrólise de ATP/ADP e separação de fita-dupla de ácido nucléico são características comuns a todas as helicases (Hall and Matson 1999).

As helicases podem ser classificadas quanto ao tipo de ácido nucléico em que a mesma atua, quanto à polaridade de separação da fita dupla, quanto ao organismo de identificação, quanto à estrutura oligomérica da proteína e quanto à presença de motivos (superfamílias) (Tuteja and Tuteja 2006).

A separação de fitas duplas de DNA/DNA, RNA/RNA, RNA/DNA e DNA/RNA conferem as helicases à denominação de DNA helicases, RNA helicases, RNA-DNA helicases e DNA-RNA helicases, respectivamente. As DNA helicases humana (HDH) I, IV e VIII, o antígeno *large T* de SV40 e a DNA helicase II do timo de bezerro são as poucas helicases que podem envolver-se tanto no metabolismo de DNA como no metabolismo de RNA (Tuteja and Tuteja 2006).

A direção do movimento das DNA helicases para a separação da dupla fita pode ser tanto na direção 3' - 5' (polaridade tipo A) ou 5' - 3' (polaridade tipo B) (Figura 4). A helicase viral E1 de

papillomavirus bovino tipo 1 (BPV1) é uma helicase cuja polaridade é do tipo 3'-5' (Singleton, Dillingham et al. 2007).

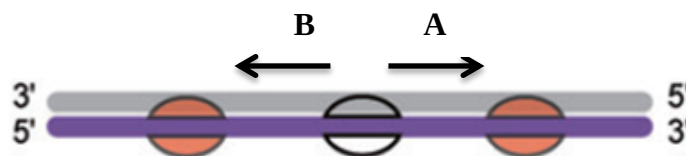


Figura 4. Direção de translocação do DNA pelas helicases. Na polaridade tipo A (3' - 5'), a enzima necessita de uma extremidade livre 3' de DNA fita simples enquanto na polaridade tipo B (5' - 3') necessita-se da extremidade livre 5'. Modificado de Singleton, Dillingham et al., (2007).

As helicases são fundamentais para o metabolismo de DNA e RNA e estão presentes em organismos procariotos, eucariotos e vírus. A primeira DNA helicase descrita, foi isolada no ano de 1976 a partir de *Escherichia coli* (Abdel-Monem, Durwald et al. 1976). Dois anos depois, foi obtida a primeira helicase de organismo eucarioto (Hotta and Stern 1978) e somente em 1986 a primeira helicase viral foi descoberta (Stahl, Droge et al. 1986). Desde então, novas helicases foram sendo encontradas e atualmente as helicases são classificadas dependendo da fonte de origem em virais, eucariotas, procariotas e derivadas de bacteriófagos.

Baseadas na similaridade e na organização de sua sequência primária, as helicases são classificadas em seis superfamílias (SF) denominadas SF1 – 6 (Ilyina, Gorbalenya et al. 1992; Gorbalenya and Koonin 1993; Singleton, Dillingham et al. 2007).

A SF1 e 2 são helicases monoméricas que participam de diversos processos celulares e sendo assim, são as helicases mais prevalentes. Estas duas famílias de helicases caracterizam-se pela presença de sete motivos conservados (Figura 5) (2002). Pertencem a SF1 as helicases Rep e UvrD de bactérias gram-negativas, a helicase PcrA de bactérias gram-positivas, RecD, Dda, Pif1 e Rrm3. As RNA helicases DEAD-box, RecQ-like e Snf2-like são constituintes da SF2 (Singleton, Dillingham et al. 2007). A diferença entre a SF1 e a SF2 é o tipo de DNA que atuam, ou seja, a SF1 é uma translocase DNAss, enquanto que a SF2 é uma translocase DNAds (Tuteja and Tuteja 2006).



Figura 5. Os sete motivos (I, Ia, II, III, IV, V e VI) conservados nas Superfamílias 1 e 2 das helicases. Modificado de Caruthers e McKay (2002).

A E1 helicase de BPV1 integra o grupo das helicases SF3 que formam hexâmeros ou duplos hexâmeros a fim de potencializar a sua atividade. Enemark e Joshua-Tor (2006), demonstrou que a estrutura cristalográfica da helicase E1 de BPV1 em complexo com DNA fita simples é composta por um rígido colar hexamérico cujo diâmetro é de aproximadamente 13 Å e que está relacionado a estabilidade do complexo (Figura 6). As subunidades adjacentes deste hexâmero constituem os sítios de ligação ao ATP e desse modo, ora apresentam-se ligadas ao ATP, ora ligada ao ADP ou ora apresentam-se vazias. Assim, cada subunidade passa por até três conformações (ATP, ADP ou vazia). O evento de ligação de ATP permite a migração do DNA pelo anel hexamérico e subsequente liberação de ADP. Assim, para cada complexo hexamérico ocorre a hidrólise de seis ATPs com a consequentemente liberação de seis ADPs e a translocação de seis nucleotídeos (Enemark and Joshua-Tor 2006). Quanto aos motivos conservados que caracterizam a SF3 eles são denominados de A (*Walker A*), B e B' (*Walker B*) e C (sensor 1 - motivo característico das SF3) (Singleton, Dillingham et al. 2007).

Já as demais superfamílias das helicases (SF4 -6) constituem pequenas famílias de proteínas que participam da replicação do DNA de bactérias e bacteriófagos (Singleton, Dillingham et al. 2007). As helicases pertencentes a SF3 – 6 precisam utilizar a estratégia de oligomerização para o seu correto funcionamento (Singleton, Dillingham et al. 2007). O processo de oligomerização é bastante eficiente uma vez que fornece para a proteína múltiplos sítios de ligação para ácidos nucleicos já que cada monômero deste complexo atua como um “cilindro” de combustão individual que possui o seu sítio de NTPase (Enemark and Joshua-Tor 2008).

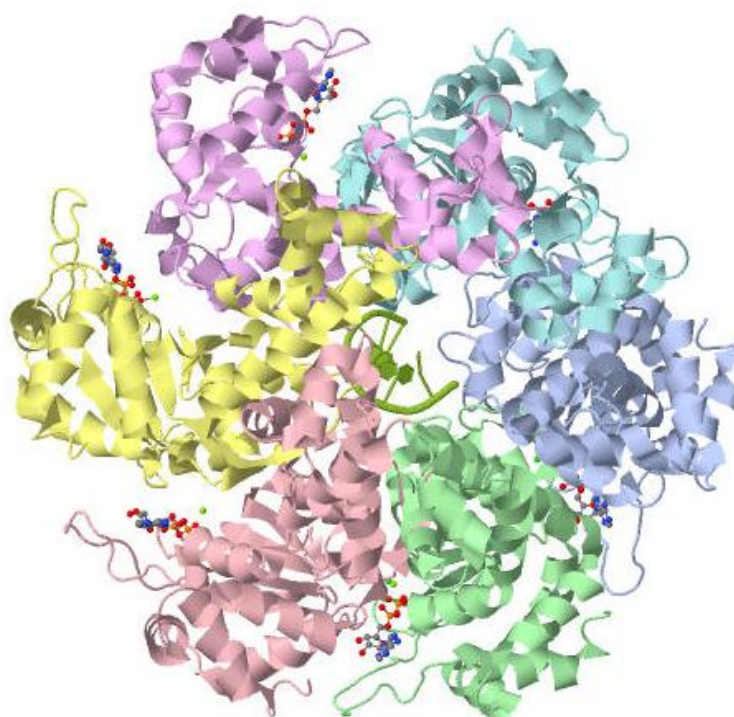


Figura 6. Visualização frontal da estrutura cristalográfica do complexo hexamérico de E1 helicase de BPV1 associada com DNA (Enemark and Joshua-Tor 2006).

2.2 Arquitetura do sítio de ATPase da proteína E1 de Papillomavirus

A determinação da estrutura cristalográfica do complexo hexamérico de E1 helicase de BPV1 ligado a uma molécula de DNA fita simples e ADP permitiu elucidar alguns detalhes atômicos do sítio de ligação ao ATP desta enzima (Enemark and Joshua-Tor 2006) (Figura 7). A ligação do ATP à enzima ocorre nas interfaces adjacentes dos domínios AAA⁺ (domínio comum às ATPases envolvidas em diversos processos celulares). Assim, em uma subunidade têm-se os motivos Walker A (GPPNTGKS), Walker B (AALVDD) e o sensor – 1, (VTSNI) enquanto na subunidade adjacente, estão presentes dois ou três resíduos básicos (Enemark and Joshua-Tor 2006).

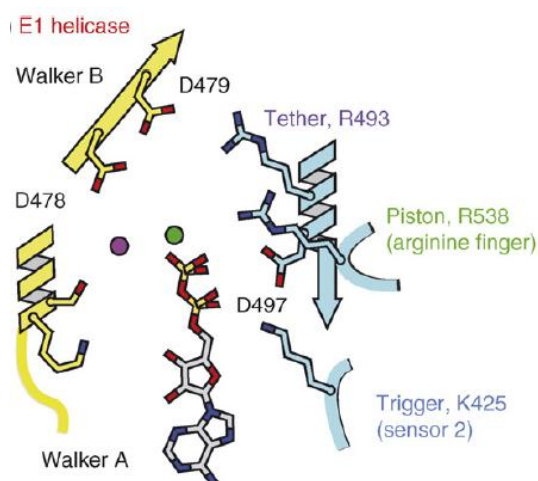


Figura 7. Sítio de ligação ao ATP de E1 helicase de papillomavirus. Modificado de Enemark e Joshua-Tor (2008).

Segundo Enemark e Joshua Tor (2006), os resíduos de aminoácidos K425 e R538 de BPV1 são importantes agentes reguladores da ligação de ATP no seu sítio. A forma como esses resíduos estão posicionados nas subunidades do hexâmero, definem as diferentes conformações (tipo ATP, ADP ou vazia) que cada subunidade pode adquirir. Na conformação tipo ATP, ocorre a interação entre o α - e β -fosfato do ATP e o grupo amino de K425 (sensor-2). Já o resíduo de aminoácido R538 liga-se tanto ao aminoácido D479 pertencente ao motivo *Walker B* quanto à molécula de água que coordena o íon Mg^{2+} (Figura 8).

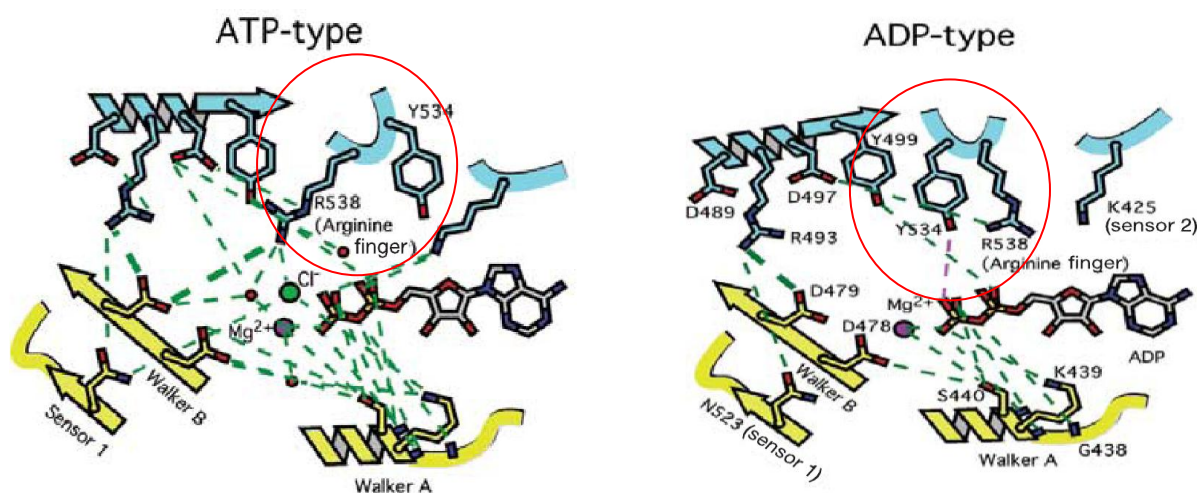


Figura 8. Interações entre as subunidades monoméricas de E1 helicase de papillomavirus e interação com ATP (lado esquerdo) e ADP (lado direito). Os círculos em vermelho destacam o deslocamento dos resíduos de aminoácidos R538 e Y534 entre as configurações tipo ATP e ADP. Modificado de Enemark e Joshua-Tor (2006).

A configuração tipo ADP é bastante flexível, visto que, muitas das interações presentes na configuração tipo ATP estão ausentes. A principal diferença entre as conformações ATP e ADP é que nesta ocorre um giro no loop que contém os resíduos Y534 e R538 e faz com que o Y534 fique entre os resíduos R538 e R493. Desse modo, a ligação do R538 com os fosfatos da molécula de ATP não podem ocorrer (Enemark and Joshua-Tor 2006) (Figura 7). A mudança de posição do resíduo R538 conduz a translocação do DNA no anel hexamérico e é ocasionada pela pressão proveniente da clivagem da ligação ADP-Pi.

Sanders *et al.*, (2007), determinou a estrutura cristalográfica do complexo hexamérico de E1 helicase de BPV na ausência de DNA e cofatores (Figura98). Este complexo, assim como a estrutura determinada previamente por Enemark e Joshua-Tor (2006), apresentou diferentes conformações no sítio de ligação ao ATP que conferem a cada monômero do complexo a denominação tipo ATP, tipo ADP ou tipo vazia. Os sítios ativos formados pelas subunidades A/B, B/C e C/D nas duas estruturas de E1 helicase mencionadas acima, formam a configuração tipo ATP. Já as subunidades D/E e E/F constituem a configuração tipo ADP. O único sítio ativo das estruturas mencionadas que não se sobrepõem totalmente é o sítio A/F, entretanto este sítio, na estrutura da E1 helicase sem os cofatores, mantém a denominação de tipo vazia. Este tipo de conformação diferencia-se da conformação tipo ADP também apenas por um deslocamento nos resíduos do sítio ativo. Na estrutura da E1 helicase em complexo com DNA e cofatores este deslocamento é de cerca de 3.5 Å, enquanto na estrutura da E1 helicase na ausência de DNA e cofatores é de aproximadamente 2 Å (Enemark and Joshua-Tor 2006; Sanders, Kovalevskiy et al. 2007).

Ademais, segundo Sanders *et al.* (2007), a flexibilidade observada nas subunidades do hexâmero é uma característica intrínseca da proteína E1 helicase e que não é influenciada pela ligação do DNA ou de seus cofatores. Desse modo, o complexo hexamérico de E1 é mantido independente da ocupação de todos os sítios consecutivos e qualquer evento em uma única subunidade, ou seja, a ligação ou hidrólise de ATP irá acarretar mudanças conformacionais em todo o sistema.

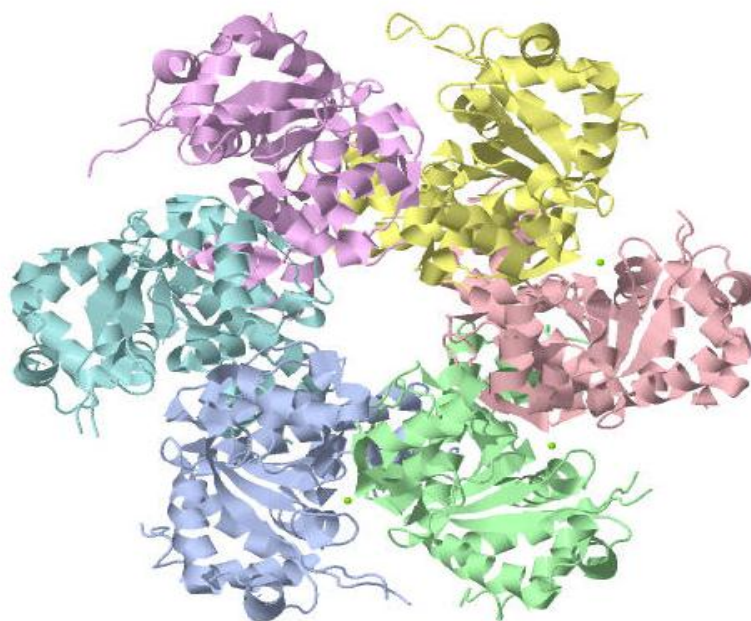


Figura 9. Visão lateral esquerda da estrutura cristalográfica de E1 helicase de BPV – 1 na ausência de DNA e cofatores (Sanders, Kovalevskiy et al. 2007).

2.3 E1 Helicases de Papillomavirus Humano

A proteína E1 de papillomavirus humano é uma DNA helicase, pertencente a SF3, dependente de ATP que participa do processo de iniciação da replicação do DNA viral. O quadro aberto de leitura (ORF) da E1 é o maior e o mais conservado entre os papillomavirus. Baseada na similaridade de sequência da proteína E1 de papillomavirus com outras proteínas com funções definidas, pode-se prever a organização dos seus domínios funcionais. A região N-terminal desta proteína (aminoácidos de 1-300) é composta pelo domínio de ligação ao DNA (DBD), cuja função é o reconhecimento da origem de replicação viral (ORI), e por uma região regulatória (Wilson, West et al. 2002).

Na porção C-terminal desta proteína encontra-se o domínio helicase, e este por sua vez, pode ser subdividido em: o domínio de oligomerização (aminoácidos ~ 300-378) e o domínio AAA+ (aminoácidos 378-605) que contem sítios funcionais envolvidos na hidrólise de ATP e translocação de DNA fita simples (Enemark and Joshua-Tor 2006) (Figura 10).

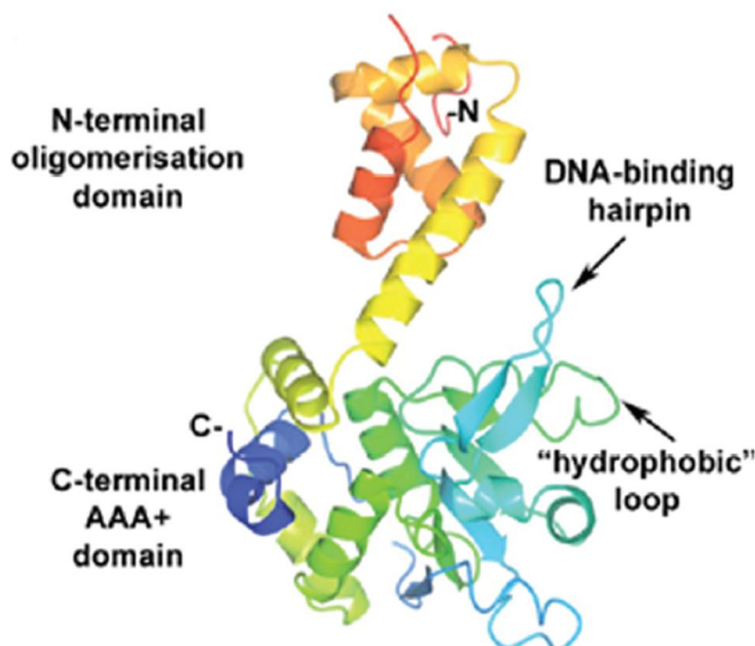


Figura 10. Organização dos domínios funcionais da proteína E1 helicase. Modificado de Sanders, Kovalevskiy et al. (2007).

A proteína E2 de papillomavirus atua como um potencializador que auxilia a proteína E1 no reconhecimento específico da ORI viral, uma vez que, a proteína E1 atuando sozinha tem baixa especificidade pelo DNA. No BPV1, o primeiro estágio para o reconhecimento da ORI, ocorre a formação do complexo $(E1)_2 - (E2)_2 - \text{DNA}$ na ORI viral, ou seja, as DBDs do dímero de E1 e do dímero de E2 estão em contato com o DNA. Em seguida, ocorre uma curvatura no DNA que promove a interação entre o domínio de transativação de E2 (E2AD) e a E1 helicase. As interações que ocorrem entre E2AD e E1 helicase são fundamentais para criar e estabilizar a montagem correta do oligômero de E1. Assim, em um processo dependente de ATP, o dímero de E2 é deslocado para fora do complexo e conseqüentemente ocorre o acoplamento de mais duas novas moléculas de E1. Assim, a adição de mais um dímero de E1 pode distorcer o DNA fita dupla e originar pequenas regiões de DNA fita simples para a formação da estrutura em forma de anel hexamérico como a DNA helicase replicativa (Sedman and Stenlund 1995; Sanders and Stenlund 1998; Abbate, Berger et al. 2004) (Figura 11).

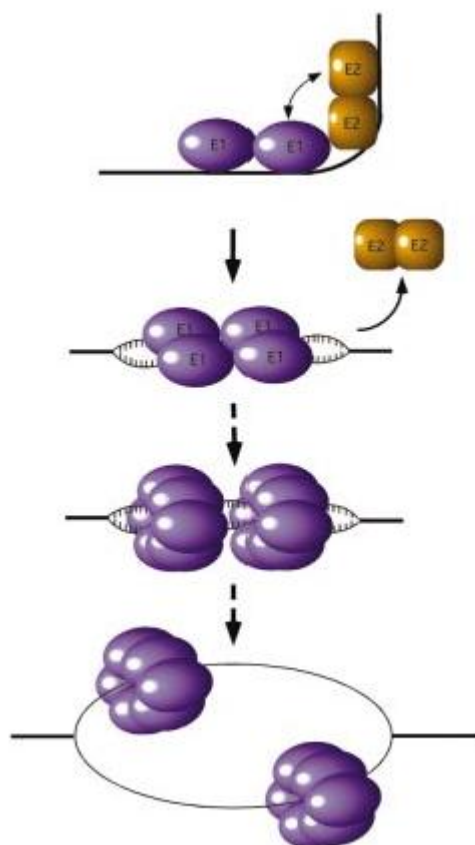


Figura 11. Representação esquemática da ligação de E1 e E2 ao DNA viral para a formação do complexo hexamérico e separação da dupla fita de DNA (Enemark, Stenlund et al. 2002).

A ligação do ATP na proteína E1 de papillomavirus é favorecida por alguns motivos conservados presentes na região C-terminal desta proteína. Mutações nesta região podem reduzir ou eliminar a atividade ATPase da proteína E1. No BPV1, a mutação P434S ou K493E no P-loop prejudica a afinidade do ATP pelo seu sítio de ligação (Sun, Thorner et al. 1990; MacPherson, Thorner et al. 1994; Hall and Matson 1999). Em geral, a E1 de papillomavirus contém uma sequência de uma ou duas prolínas (GPP/NA/DTGKS) que favorecem a ligação ao ATP. O P-loop da E1 de HPV16 possui a sequência GAANTGKS e sua afinidade pelo ATP é bastante fraca. Contudo, foi observado que esta afinidade pode ser aumentada em caso de substituição das duas alaninas por prolina. Além disso, o P-loop parece estar envolvido no processo de dimerização de E1 e na interação E1-E2 (Wilson, West et al. 2002).

Acredita-se ainda que a perda do gene E1 em células malignizadas pelo processo de integração viral possa funcionar como uma estratégia de crescimento seletivo das células (Romanczuk and Howley 1992; Finzer, Aguilar-Lemarroy et al. 2002). Ademais, a proteína E1

interage com algumas proteínas da célula hospedeira que possuem funções na regulação e replicação viral (Wilson, West et al. 2002).

Existem disponíveis no mercado duas vacinas capazes de impedir a infecção pelo HPV: a quadrivalente Gardasil (Merck and Co., NJ, USA), que confere proteção contra os tipos virais 06, 11, 16 e 18, e a bivalente Cervarix (GlaxoSmithKline, London, UK), que confere proteção aos tipos de HPV de alto risco 16 e 18 (Pomfret, Gagnon et al. 2011). Ambas as vacinas são baseadas em VLPs da proteína L1, ou seja, este tipo de vacinação com VLPs é capaz de neutralizar os anticorpos e de prevenir a infecção de HPV uma vez que as VLPs são estruturalmente idênticas ao HPV, mas que não possuem o DNA viral (Figura 12).

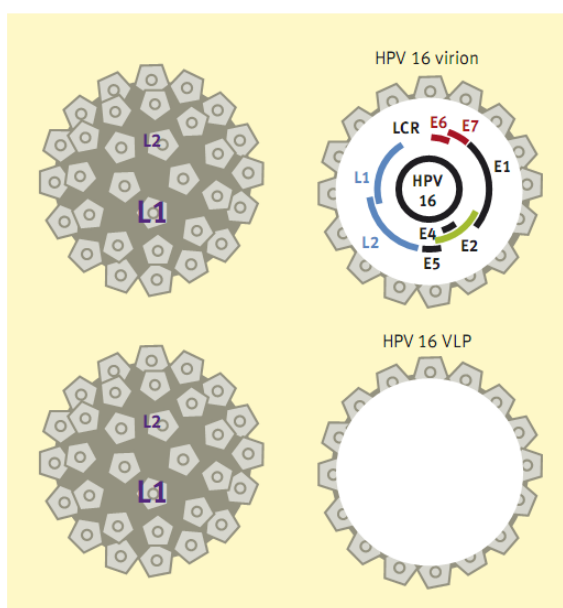


Figura 12. Representação esquemática de um vírion e uma VLP (vírus-like particles) de papillomavirus humano (HPV) demonstrando a semelhança estrutural de ambos sem o DNA viral (Tristram and Fiander 2007).

Existem divergências quanto à eficácia terapêutica destas vacinas profiláticas em neoplasias já estabelecidas. Alguns estudos mostram pouca ou nenhuma eficácia terapêutica destas vacinas (Ault 2007; Hildesheim, Herrero et al. 2007), enquanto outros mostram o efeito terapêutico em pacientes com alto grau de câncer cervical e lesões genitais externas (Kjaer, Sigurdsson et al. 2009).

Além de conferir proteção a apenas quatro (HPV6, 11, 16 e 18) dos quase 200 tipos de HPVs existentes atualmente, as vacinas baseadas em VLPs de L1 são bastante caras e devem ser administradas em três doses. Este fato impede a vacinação em massa de indivíduos residentes nos países mais pobres onde há o maior número de pessoas infectadas (Shi, Sings et al. 2007; Tristram and Fiander 2007; Keam and Harper 2008).

Assim, a busca por novos fármacos que possam abranger uma proteção a um número maior de tipos virais de HPVs têm sido realizada. A proteína E1 é um alvo potencial para o desenvolvimento destes fármacos inibidores, visto que a mesma possui a ORF mais bem conservada entre todos os genes e é uma DNA helicase que desempenha um papel fundamental na replicação viral (Phelps, Barnes et al. 1998; Frick 2003; Sterlinko Grm and Banks 2004; White, Faucher et al. 2005).

White, Faucher *et al.* (2005) testou a atividade inibidora de nove compostos derivados do ácido bifenilsulfonacético sobre a atividade ATPase de E1 helicase dos HPVs tipos 6, 11 e 18 (Figura 13). O composto nº 9 foi capaz de inibir parcialmente a atividade ATPase da proteína E1 de HPV6 e HPV18. A inibição da atividade ATPase de E1 foi atribuída a presença do aminoácido tirosina (Y) na posição 486 (HPV6) e 492 (HPV18) desta proteína (Figura 14). Este mesmo composto quando testado com a E1 de HPV11 foi menos ativo, entretanto, após realizar a mutação C486Y (Figura 15) foi verificado um aumento na inibição da atividade ATPase desta proteína.

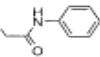
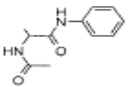
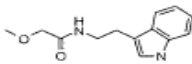
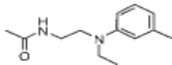
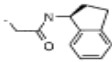
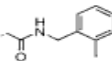
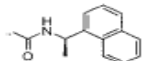
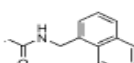
Inhibitor no.	Structure of:		IC ₅₀ (nM)		
	R1	R2	HPV6	HPV11	HPV18
1	H	H	2,000 ± 400	14,000 ± 2,000	3,600 ± 1,300
2	H		160 ± 40	3,300 ± 1,000	620 ± 70
3	H		190 ± 40	3,200 ± 300	
4	H		170 ± 30	3,000 ± 600	
5	H		2,000 ± 700	1,800 ± 10	6,900 ± 1,900
6		H	20 ± 3	11,000 ± 6,000	
7		H	32 ± 4	12,000 ± 2,000	11,000 ± 20
8		H	4.5 ± 0.6	11,000 ± 7,000	
9		H	4.3 ± 1.1	3,400 ± 1,700	2,300 ± 40

Figura 13. Estrutura química dos nove inibidores potenciais contra a atividade ATPase de E1 helicase dos HPVs 6, 11 e 16 utilizados no estudo de White, Faucher et al. (2005). A metade da concentração inibitória mínima (IC₅₀) é apresentada para cada um dos HPVs testados.

O aminoácido Y486 de HPV6 foi indicado, no referido estudo, como o resíduo fundamental para a ligação do inibidor derivado do ácido bifenilsulfonacético já que o mesmo localiza-se na mesma α -hélice que o aminoácido que se liga ao ATP no sítio de ATPase – a lisina (K484).

HPV6a (459)	SKF KLW LHGT PKKNC IAIV GPPDTGKS	Y	FCMS LISFLG
HPV11 (459)	SKL KLW LHGT PKKNC IAIV GPPDTGKS	C	FCMS LIKFLG
HPV16 (458)	TAL KRFLQGI PKKNC ILLY GAANTGKS	L	FGMS LMKFLQ
HPV18 (465)	GAL KSFLKGT PKKNC LVFC GPANTGKS	Y	FGMS FIHFIQ
BPV1 (414)	NAL KLW L KGI PKKNC LAFI GPPNTGKS	M	LCNS LIHFLG

Figura 14. Parte da sequência de aminoácidos da E1 helicase dos HPVs 6, 11, 16 e 18 e BPV1. Os resíduos que são conservados entre todos os tipos de HPV em questão estão em vermelho, os altamente conservados estão em azul e os demais resíduos estão em preto. Modificado de White, Faucher et al (2005).

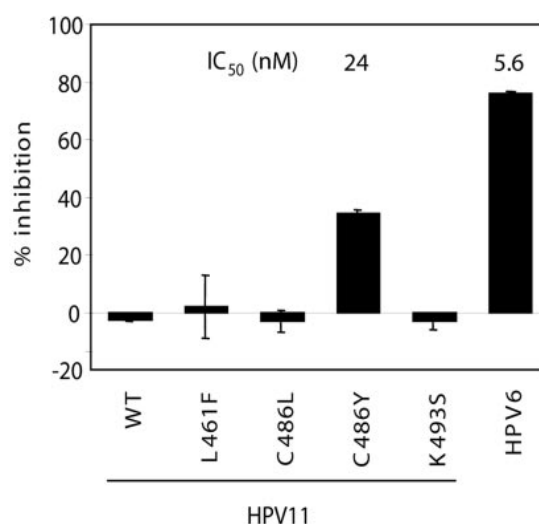


Figura 15. A inibição da atividade ATPase utilizando 10 nM do composto nº 9 para a E1 helicase dos HPVs 11 (WT), os mutantes de HPV11 L461F, C486L, C486Y e K493S e o HPV6. Modificado de White, Faucher et al. (2005).

Como não foi encontrado nenhum outro sítio de ligação além do sítio ATPase na E1 helicase de HPV18, White, Faucher *et al.* (2005), propôs que os inibidores derivados do ácido bifenilsulfonacético pudessem se ligar ao aminoácido Y486 (HPV6) e por inibição alostérica impedir a ligação do ATP no seu sítio ATPase da E1 helicase.

Assim, compreender a interação da proteína E1 de HPV com o composto nº 9 derivado do ácido bifenilsulfonacético, bem como, determinar a influência dos resíduos de aminoácidos localizados no sítio ATPase desta proteína na ligação de inibidores, é de fundamental importância para o desenho racional de fármacos inibidores desta proteína. A inexistência de estruturas cristalográficas do complexo inibidor-proteína impossibilita o esclarecimento sobre o modo de interação e, desse modo, é essencial a utilização de ferramentas *in silico* para tal propósito.

2.4 O Emprego de Ferramentas *in silico* para o Desenho de Fármacos

A predição *in silico* da conformação de um ligante em seu alvo biológico é um problema bastante complexo e de grande interesse no ramo do descobrimento de novos fármacos, uma vez que, os modelos gerados podem ser utilizados antes de se recorrer a experimentações *in vitro* e *in vivo* para fazer predições acerca da atividade biológica de fármacos em seus ligantes (Li, Zhang et al. 2011). Assim sendo, as indústrias farmacêuticas têm lançado mão nos últimos anos de abordagens computacionais para a predição do docking (encaixe) do ligante na proteína-alvo para o descobrimento de muitos fármacos candidatos (Hillisch, Pineda et al. 2004; Ferrara and Jacoby 2007; Cavasotto and Phatak 2009; Bordogna, Pandini et al. 2011; Fuentes, Dastidar et al. 2011; Jr 2011).

Os defeitos enzimáticos estão bastante relacionados ao surgimento de diversas patologias no ser humano. Desse modo, as enzimas são um alvo terapêutico bastante explorado pelas indústrias farmacêuticas e assim sendo, os fármacos cujo mecanismo de ação é a inibição enzimática são muito bem sucedidos (Copeland, Harpel et al. 2007). O reconhecimento do sítio de ligação do inibidor é fundamental para a otimização do processo de desenho do fármaco. A ligação do fármaco inibidor ocorrerá ou no sítio ativo da enzima e desse modo, impedirá a ligação do substrato (inibição competitiva) ou o inibidor se ligará a um sítio próximo do sítio ativo da enzima e causará uma mudança conformacional na mesma que será capaz de modificar o seu sítio ativo.

Conhecer a estrutura da proteína é fundamental para a predição da conformação de fármacos. Desse modo, para a determinação estrutural da proteína podem-se utilizar tanto métodos experimentais (ressonância nuclear magnética, raios-X, microscopia eletrônica, entre outros) como métodos *in silico* (*ab initio*, modelagem por homologia, entre outros). Na última década o número de estruturas de proteínas determinadas experimentalmente que foram depositadas no Protein Data Bank - PDB (banco de dados de proteínas) (Bernstein, Koetzle et al. 1977) cresceu mais de 400%, ou seja, no ano 2000 eram 12140 estruturas de proteínas e em março do ano corrente esse número é de 66290 estruturas. Apesar do crescente aumento, este número de estruturas disponíveis é muito pequeno em relação ao número de proteínas existentes, e assim sendo, a maioria das proteínas que estão relacionadas a alguma doença não possuem a sua estrutura experimental.

Assim, nos casos em que a proteína em estudo (proteína-alvo) não tiver ainda sido determinada experimentalmente, mas exista uma proteína homóloga a ela (proteína-molde) depositada no PDB e ambas possuam uma identidade maior ou igual a 30% pode-se utilizar de abordagens de modelagem molecular por homologia para a determinação da estrutura tridimensional da proteína-problema (Saha and Chakrabarti 2006; Sun and Scott 2010). Na modelagem por homologia após a escolha da proteína-molde às sequências primárias são alinhadas,

as coordenadas do modelo da proteína-alvo são construídas e o modelo final é validado. (Filho and Alencastro 2003). Diferentes métodos e programas podem ser utilizados para cada uma das etapas da modelagem por homologia (Tabela 2).

Tabela 2. Programas e servidores da internet utilizados em modelagem por homologia.

	NOME	LINK	REFERÊNCIA
Banco de dados			
	GenBank	www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank	(Benson, Karsch-Mizrachi et al. 2000)
	EMBL-EBI	www.ebi.ac.uk	(Emmert, Stoehr et al. 1994)
	PDB	www.rcsb.org/pdb	(Berman, Westbrook et al. 2000)
	Swiss-Prot	www.expasy.org/sprot	(Bairoch and Apweiler 1997; Gasteiger, Jung et al. 2001)
Alinhamento de sequencias			
	BLAST	www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	(Altschul, Gish et al. 1990)
	ClustalW	www.clustal.org	(Jeanmougin, Thompson et al. 1998)
	MUSCLE	www.drive5.com/muscle	(Edgar 2004)
Modelagem de proteínas			
	Geno3D	www.geno3d-pbil.ibcp.fr	(Combet, Jambon et al. 2002)
	MODELLER	www.salilab.org/modeller	(Sali and Blundell 1993)
	SWISS-MODEL	www.swissmodel.expasy.org	(Peitsch 1996)
Validação dos modelos			
	PROCHECK	www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/	(Laskowski, Macarthur et al. 1993)
	WHAT IF	www.cmbi.kun.nl/whatif	(Vriend 1990)

Após a ciência da estrutura tridimensional da proteína-alvo, o docking proteína-ligante pode ser realizado a fim de prever geometricamente e energeticamente o encaixe de uma molécula no sítio ativo da proteína. Com este propósito, o programa AutoDock (Huey, Morris et al. 2007) é atualmente o programa mais amplamente utilizado e testado (Souza, Fernandes et al. 2006). Ambas as flexibilidades do ligante e dos resíduos do sítio de ligação da proteína podem ser tratadas durante a simulação de docking molecular. O resultado final da simulação de docking ranqueia conformações entre o ligante e a proteína segundo o critério da menor energia de ligação, isto é, que apresente o melhor encaixe (Morris, Huey et al. 2009).

Os modelos tridimensionais de proteínas gerados por homologia são cada vez mais utilizados para estudos de docking proteína-ligante, haja vista, o baixo número de estruturas cristalográficas de proteínas disponíveis. A boa acurácia dos resultados de docking com estruturas de proteínas geradas por homologia é garantida desde que se utilize de modelos de boa qualidade que foram gerados a partir de moldes com proteínas homólogas e que as mesmas possuam uma alta identidade de sequências (Bordogna, Pandini et al. 2011).

As proteínas são macromoléculas altamente dinâmicas e que apresentam diferentes estados conformacionais. Para o desenho de fármacos é imprescindível levar em consideração tal flexibilidade, uma vez que, a flexibilidade da proteína influenciará a afinidade do ligante no seu sítio ativo (Durrant and McCammon 2010). A simulação de dinâmica molecular é um método computacional que considera a flexibilidade global da proteína em estudo e gera numerosas possíveis conformações da mesma. Neste método, as posições atômicas de cada átomo constituinte do sistema são modeladas a partir de campos de força. As mudanças das posições atômicas são computadas em diferentes instantes de tempo por meio da resolução da equação Newtoniana do movimento. Ao final da simulação, a trajetória de equilíbrio do sistema é descrita por meio das coordenadas do sistema em função do tempo. Desse modo, ao final da simulação têm-se as diferentes conformações que a estrutura pode adquirir ao longo do tempo e assim, muitas propriedades físicas macroscópicas podem ser compreendidas e preditas por meio de simulações de dinâmica molecular (D. van der Spoel, Lindahl et al. 2010).

A identificação, por meio de simulações de dinâmica molecular, de um sítio ativo anteriormente desconhecido na estrutura cristalográfica da proteína integrase do HIV (vírus da imunodeficiência humana) (Schames, Henchman et al. 2004), permitiu o desenvolvimento pela empresa farmacêutica Merk® de um novo fármaco, Raltegravir, utilizado no tratamento de pacientes soropositivos. Recentemente, o estudo do complexo raltegravir-integrase, por meio de simulações de dinâmica molecular, permitiu visualizar os efeitos da flexibilidade da proteína no mecanismo de resistência do fármaco em questão. Assim, este estudo contribuirá *a posteriori* para o desenho de novos inibidores que levem em consideração possíveis mecanismos de resistência do fármaco Raltegravir (Perryman, Forli et al. 2010).

Outro exemplo de aplicação de simulações de dinâmica molecular no estudo proteína-ligante é o de Bandyopadhyay and Meher (2006). Neste estudo, por meio de simulações de dinâmica molecular, foi verificado que a variação em um único nucleotídeo na cadeia B da HIV protease é capaz de aumentar a afinidade do inibidor a esta proteína e também que pequenas mudanças conformacionais nos resíduos da região do *flap* têm implicações na ligação do inibidor.

Diante do exposto, fica claro que o emprego de métodos computacionais pode esclarecer interações moleculares importantes entre o ligante e os resíduos do sítio ativo de proteínas

auxiliando no desenvolvimento de novos fármacos e, além disso, permitem extrair informações extremamente úteis acerca da dinâmica da proteína que não podem ser retiradas da estrutura cristalográfica. Na tabela 3 são listados alguns programas e servidores que podem ser utilizados para simulações de dinâmica molecular.

Tabela 3. Programas e servidores que podem ser utilizados para simulações de dinâmica molecular.

NOME	LINK	REFERÊNCIA
CHARMM	www.charmm.org	(Brooks, Brooks et al. 2009)
AMBER	ambermd.org	(Case, Cheatham et al. 2005)
GROMACS	www.gromacs.org	(Heiss, Kutzner et al. 2008)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a influência da dinâmica conformacional da E1 Helicase de papillomavirus na interação com ligantes.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar os modelos tridimensionais da proteína E1 helicase dos HPV6, HPV11 e HPV16 a partir de estruturas cristalográficas.
- Definir a localização do sítio de ligação do composto nº 9 derivado do ácido bifenilsulfonacético na E1 helicase dos HPV6, 11, 16, 18 e BPV1 por meio de estudos de docking molecular.
- Verificar por meio de simulações de dinâmica molecular da E1 helicase de HPV18 a mobilidade dos resíduos envolvidos na ligação com o composto nº 9 derivado do ácido bifenilsulfonacético.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbate, E. A., J. M. Berger, et al. (2004). "The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2." Genes Dev **18**(16): 1981-1996.
- Abdel-Monem, M., H. Durwald, et al. (1976). "Enzymic unwinding of DNA. 2. Chain separation by an ATP-dependent DNA unwinding enzyme." Eur J Biochem **65**(2): 441-449.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." Journal of molecular biology **215**(3): 403-410.
- Ault, K. A. (2007). "Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials." Lancet **369**(9576): 1861-1868.
- Bairoch, A. and R. Apweiler (1997). "The SWISS-PROT protein sequence database: its relevance to human molecular medical research." Journal of molecular medicine **75**(5): 312-316.
- Bandyopadhyay, P. and B. R. Meher (2006). "Drug resistance of HIV-1 protease against JE-2147: I47V mutation investigated by molecular dynamics simulation." Chemical biology & drug design **67**(2): 155-161.
- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, et al. (2000). "GenBank." Nucleic acids research **28**(1): 15-18.
- Berman, H. M., J. Westbrook, et al. (2000). "The Protein Data Bank." Nucleic acids research **28**(1): 235-242.
- Bernard, H.-U., R. D. Burk, et al. (2010). "Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments." Virology **401**: 70-79.
- Bernard, H. U. (2005). "The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses." J Clin Virol **32 Suppl 1**: S1-6.
- Bernstein, F. C., T. F. Koetzle, et al. (1977). "The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures." Journal of molecular biology **112**(3): 535-542.
- Bodily, J. and L. A. Laimins (2010). "Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression." TRENDS in Microbiology.
- Bordogna, A., A. Pandini, et al. (2011). "Predicting the accuracy of protein-ligand docking on homology models." Journal of Computational Chemistry **32**(1): 81-98.
- Brandstetter, T., S. Bohmer, et al. (2010). "A polymer-based DNA biochip platform for human papilloma virus genotyping." Journal of virological methods **163**(1): 40-48.
- Brooks, B. R., C. L. Brooks, 3rd, et al. (2009). "CHARMM: the biomolecular simulation program." Journal of Computational Chemistry **30**(10): 1545-1614.
- Caruthers, J. M. and D. B. McKay (2002). "Helicase structure and mechanism." Curr Opin Struct Biol **12**(1): 123-133.
- Case, D. A., T. E. Cheatham, 3rd, et al. (2005). "The Amber biomolecular simulation programs." Journal of Computational Chemistry **26**(16): 1668-1688.
- Castlellsagué, X., S. d. Sanjosé, et al. (2007). HPV and Cervical Cancer in the World 2007 Report, Vaccine. **25**.
- Cavasotto, C. N. and S. S. Phatak (2009). "Homology modeling in drug discovery: current trends and applications." Drug discovery today **14**(13-14): 676-683.
- Combet, C., M. Jambon, et al. (2002). "Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein." Bioinformatics **18**(1): 213-214.
- Copeland, R. A., M. R. Harpel, et al. (2007). "Targeting enzyme inhibitors in drug discovery." Expert opinion on therapeutic targets **11**(7): 967-978.
- D. van der Spoel, E., B. Lindahl, et al. (2010). Gromacs User Manual version 4.5.
- de Villiers, E. M., C. Fauquet, et al. (2004). "Classification of papillomaviruses." Virology **324**(1): 17-27.
- Durrant, J. D. and J. A. McCammon (2010). "Computer-aided drug-discovery techniques that account for receptor flexibility." Current Opinion in Pharmacology **10**(6): 770-774.

- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity." BMC bioinformatics **5**: 113.
- Emmert, D. B., P. J. Stoeck, et al. (1994). "The European Bioinformatics Institute (EBI) databases." Nucleic acids research **22**(17): 3445-3449.
- Enemark, E. J. and L. Joshua-Tor (2006). "Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase." Nature **442**(7100): 270-275.
- Enemark, E. J. and L. Joshua-Tor (2008). "On helicases and other motor proteins." Curr Opin Struct Biol **18**(2): 243-257.
- Enemark, E. J., A. Stenlund, et al. (2002). "Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex." EMBO J **21**(6): 1487-1496.
- Favre, M., N. Ramoz, et al. (1997). "Human papillomaviruses: general features." Clin Dermatol **15**(2): 181-198.
- Ferrara, P. and E. Jacoby (2007). "Evaluation of the utility of homology models in high throughput docking." Journal of molecular modeling **13**(8): 897-905.
- Filho, O. A. S. and R. B. d. Alencastro (2003). "Modelagem de proteínas por homologia." Química Nova **26**(2): 253-259.
- Finzer, P., A. Aguilar-Lemarroy, et al. (2002). "The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis." Cancer Lett **188**(1-2): 15-24.
- Frick, D. N. (2003). "Helicases as antiviral drug targets." Drug News Perspect **16**(6): 355-362.
- Fuentes, G., S. G. Dastidar, et al. (2011). "Role of Protein Flexibility in the Discovery of New Drugs." Drug development research **72**: 26-35.
- Gasteiger, E., E. Jung, et al. (2001). "SWISS-PROT: connecting biomolecular knowledge via a protein database." Current issues in molecular biology **3**(3): 47-55.
- Gorbalenya, A. E. and E. V. Koonin (1993). "Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships." Current Opinion in Structural Biology **3**: 419.
- Hall, M. C. and S. W. Matson (1999). "Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding." Mol Microbiol **34**(5): 867-877.
- Heiss, B., C. Kutzner, et al. (2008). "GROMACS 4, Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation." Chem Theory Comput **4**: 435-447.
- Hildesheim, A., R. Herrero, et al. (2007). "Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial." JAMA : the journal of the American Medical Association **298**(7): 743-753.
- Hillisch, A., L. F. Pineda, et al. (2004). "Utility of homology models in the drug discovery process." Drug discovery today **9**(15): 659-669.
- Hotta, Y. and H. Stern (1978). "DNA unwinding protein from meiotic cells of *Lilium*." Biochemistry **17**(10): 1872-1880.
- Huey, R., G. M. Morris, et al. (2007). "A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation." Journal of Computational Chemistry **28**(6): 1145-1152.
- Ilyina, T. V., A. E. Gorbalenya, et al. (1992). "Organization and evolution of bacterial and bacteriophage primase-helicase systems." J Mol Evol **34**(4): 351-357.
- INCA (2006). Estimativas de Incidência para o Câncer de Colo Uterino para o ano de 2006. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde/ Instituto Nacional do Câncer
- INCA (2009). Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer: 98.
- Jeanmougin, F., J. D. Thompson, et al. (1998). "Multiple sequence alignment with Clustal X." Trends in biochemical sciences **23**(10): 403-405.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2006). "Cancer statistics, 2006." CA Cancer J Clin **56**(2): 106-130.
- Jr, F. R. S. (2011). "Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery." Current Opinion in Pharmacology **10**: 738-744.
- Keam, S. J. and D. M. Harper (2008). "Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]." Drugs **68**(3): 359-372.

- Kjaer, S. K., K. Sigurdsson, et al. (2009). "A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions." Cancer prevention research **2**(10): 868-878.
- Laskowski, R. A., A. Macarthur, et al. (1993). "PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures." J. Appl. Cryst. **26**(2): 283-291.
- Li, Z., H. Zhang, et al. (2011). "Drug resistant mechanism of diaryltriazine analog inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase using molecular dynamics simulation and 3D-QSAR." Chemical biology & drug design **77**(1): 63-74.
- MacPherson, P., L. Thorner, et al. (1994). "The bovine papilloma virus E1 protein has ATPase activity essential to viral DNA replication and efficient transformation in cells." Virology **204**(1): 403-408.
- Markowitz, L. E. (2007). "Quadrivalent human papillomavirus vaccine: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP)." MMWR Recomm Rep **56**: 1-24.
- Morris, G. M., R. Huey, et al. (2009). "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility." Journal of Computational Chemistry **30**(16): 2785-2791.
- Munger, K. (2004). "Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis." Journal of Virology **78**: 11451 - 11460.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Patel, S. S. and K. M. Picha (2000). "Structure and function of hexameric helicases." Annu Rev Biochem **69**: 651-697.
- Peitsch, M. C. (1996). "ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling." Biochemical Society transactions **24**(1): 274-279.
- Perryman, A. L., S. Forli, et al. (2010). "A dynamic model of HIV integrase inhibition and drug resistance." Journal of molecular biology **397**(2): 600-615.
- Phelps, W. C., J. A. Barnes, et al. (1998). "Molecular targets for human papillomaviruses: prospects for antiviral therapy." Antivir Chem Chemother **9**(5): 359-377.
- Pomfret, T. C., J. M. Gagnon, Jr., et al. (2011). "Quadrivalent human papillomavirus (HPV) vaccine: a review of safety, efficacy, and pharmacoeconomics." Journal of clinical pharmacy and therapeutics **36**(1): 1-9.
- Romanczuk, H. and P. M. Howley (1992). "Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity." Microbiology **89**: 3159-3163.
- Saha, R. P. and P. Chakrabarti (2006). "Molecular modeling and characterization of Vibrio cholerae transcription regulator HlyU." BMC structural biology **6**: 24.
- Sali, A. and T. L. Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." Journal of molecular biology **234**(3): 779-815.
- Sanders, C. M., O. V. Kovalevskiy, et al. (2007). "Papillomavirus E1 helicase assembly maintains an asymmetric state in the absence of DNA and nucleotide cofactors." Nucleic Acids Res **35**(19): 6451-6457.
- Sanders, C. M. and A. Stenlund (1998). "Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor." EMBO J **17**(23): 7044-7055.
- Schames, J. R., R. H. Henchman, et al. (2004). "Discovery of a novel binding trench in HIV integrase." Journal of medicinal chemistry **47**(8): 1879-1881.
- Sedman, J. and A. Stenlund (1995). "Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro." EMBO J **14**(24): 6218-6228.
- Shi, L., H. L. Sings, et al. (2007). "GARDASIL: prophylactic human papillomavirus vaccine development--from bench top to bed-side." Clinical pharmacology and therapeutics **81**(2): 259-264.
- Singleton, M. R., M. S. Dillingham, et al. (2007). "Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases." Annu Rev Biochem **76**: 23-50.

- Souza, S. F., P. A. Fernandes, et al. (2006). "Protein–Ligand Docking: Current Status and Future Challenges." PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics **65**: 15-26.
- Stahl, H., P. Droge, et al. (1986). "DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen." EMBO J **5**(8): 1939-1944.
- Stanley, M. (2009). "A practitioner's guide to understanding immunity to human papillomavirus." US Obstet Gynecol **4**: 2-7.
- Sterlinko Grm, H. and L. Banks (2004). "HPV proteins as targets for therapeutic intervention." Antivir Ther **9**(5): 665-678.
- Sun, H. and D. O. Scott (2010). "Structure-based drug metabolism predictions for drug design." Chemical biology & drug design **75**(1): 3-17.
- Sun, S., L. Thorner, et al. (1990). "Identification of a 68-kilodalton nuclear ATP-binding phosphoprotein encoded by bovine papillomavirus type 1." J Virol **64**(10): 5093-5105.
- Terhune, S. S., W. G. Hubert, et al. (2001). "Early polyadenylation signals of human papillomavirus type 31 negatively regulate capsid gene expression." J Virol **75**(17): 8147-8157.
- Tristram, A. and A. Fiander (2007). "Human papillomavirus (including vaccines)." OBSTETRICS, GYNAECOLOGY AND REPRODUCTIVE MEDICINE **17**(11): 324-329.
- Tristram, A. and A. Fiander (2007). "Human Papillomavirus (including vaccines)." Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine **17**: 324 - 329.
- Tuteja, N. and R. Tuteja (2006). "Helicases as molecular motors: An insight." Physica A **372**: 83.
- Vriend, G. (1990). "WHAT IF: a molecular modeling and drug design program." Journal of molecular graphics **8**(1): 52-56, 29.
- White, P. W., A. M. Faucher, et al. (2005). "Biphenylsulfonacetic acid inhibitors of the human papillomavirus type 6 E1 helicase inhibit ATP hydrolysis by an allosteric mechanism involving tyrosine 486." Antimicrob Agents Chemother **49**(12): 4834-4842.
- Wilson, V. G., M. West, et al. (2002). "Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features." Virus Genes **24**(3): 275-290.
- zur Hausen, H. (2000). "Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis." J Natl Cancer Inst **92**(9): 690-698.
- zur Hausen, H. (2009). "Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account." Virology **384**(2): 260-265.
- Zur Hausen, H. (2009). "The search for infectious causes of human cancers: where and why." Virology **392**(1): 1-10.

5. ARTIGO 1

1. TÍTULO: Influência da Dinâmica Conformacional da E1 Helicase de Papillomavirus na Interação com Ligantes
2. AUTORES: Nataly Amorim de Santana, José Luiz de Lima Filho, Roberto Dias Lins
3. SITUAÇÃO: A ser submetido

INFLUÊNCIA DA DINÂMICA CONFORMACIONAL DA E1 HELICASE DE PAPILLOMAVIRUS NA INTERAÇÃO COM LIGANTES

Nataly Amorim de Santana^{1,2}, José Luiz de Lima Filho^{1,4}, Roberto Dias Lins^{2,3*}

¹ Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática (ProspecMol), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE, Brasil.

² Grupo de Modelagem de Biomateriais, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE, Brasil.

³ Departamento de Química Fundamental - Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE, Brasil.

⁴ Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE, Brasil.

*** Correspondência:**

Departamento de Química Fundamental

Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE, Brasil

Campus Universitário, Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil - CEP: 50670-901

Fone: + 55 81 2126 8440 - Fax: + 55 81 2126 8442

e-mail: roberto.lins@ufpe.br

RESUMO

A infecção pelo papillomavirus humano (HPV) é o principal agente causal para o desenvolvimento de câncer de colo uterino que é a segunda causa de morte por câncer em mulheres no mundo e o segundo tipo de câncer mais frequente em mulheres na faixa etária de 15 a 44 anos. Além disso, é cada vez mais frequente a infecção por HPV em diferentes sítios do corpo humano ocasionando tanto lesões malignas quanto benignas. Dada à importância clínica na saúde pública mundial desta infecção, têm surgido esforços da comunidade científica a fim de desenvolver fármacos que possam inibir e/ou impedir a infecção desse vírus. Neste sentido, a proteína E1 é uma das proteínas virais que têm sido investigadas como um alvo potencial para o desenvolvimento destes fármacos, já que a mesma é uma DNA helicase que participa do processo de replicação viral. O potencial inibidor de derivados do ácido bifenilsulfonacético na inibição da atividade ATPase de E1 foi verificado em estudos anteriores. O derivado nº 9 teve maior eficácia na inibição da atividade ATPase da E1 helicase de HPV6 do que na E1 helicase de HPV11. Como não foi encontrado nenhum outro sítio de ligação além do sítio ATPase na E1 de HPV18, esta diferença de inibição observada entre os HPVs estudados foi atribuída a ligação do derivado nº 9 ao aminoácido Y486 de HPV6 que resulta uma mudança conformacional no sítio ATPase e consequentemente impede a ligação do ATP ao referido sítio. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar o docking e a dinâmica molecular a fim de compreender o modo de ligação do derivado nº 9 do ácido bifenilsulfonacético na E1 helicase de HPV, além de, determinar a influência dos resíduos de aminoácidos localizados no sítio ATPase na afinidade com o inibidor. Os resultados mostraram que o derivado nº 9 do ácido bifenilsulfonacético e o ATP competem pelo mesmo sítio de ligação e, além disso, as mobilidades observadas no P-loop e nos resíduos de aminoácidos A486, K490, S491 e Y492 do sítio ATPase podem determinar a diferença de afinidade do complexo proteína-inibidor.

Keywords: HPV, E1 helicase, Ácido Bifenilsulfonacético.

INTRODUÇÃO

O Papillomavirus humano (HPV) está associado à ocorrência de lesões benignas e malignas em uma grande variedade de sítios no corpo humano (zur Hausen 2009). A infecção do trato genital feminino pelo HPV é a infecção sexualmente transmitida mais comum, como também, é o principal fator de risco para o surgimento de câncer de colo de útero - a segunda maior causa de morte por câncer em mulheres no mundo (Markowitz 2007; Bodily and Laimins 2010). A proteína E1 é um alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos inibidores do HPV, visto que, a mesma possui a ORF (*open reading frame* – quadro aberto de leitura) mais bem conservada entre todos os genes e é uma DNA helicase que desempenha um papel fundamental na replicação viral (Phelps, Barnes et al. 1998; Frick 2003; Sterlinko Grm and Banks 2004; White, Faucher et al. 2005). Em estudo realizado por White, Faucher *et al.*, (2005), o ácido bifenilsulfonacético e seus derivados foram capazes de inibir a atividade ATPase da proteína E1 de HPV6. Esta inibição da atividade ATPase foi atribuída a um único aminoácido de tirosina localizado próximo ao sítio ATPase na posição 486 de HPV6. Contudo, como não foram encontrados nenhum outro potencial sítio de ligação além do sítio ATPase no HPV, acredita-se que a ligação dos componentes inibidores a esta tirosina possa ocasionar uma mudança conformacional no sítio de ligação ao ATP que seja capaz de alterar a afinidade do mesmo. Desse modo, o presente estudo objetivou por meio de abordagens de modelagem, dinâmica e docking molecular, determinar a influência da dinâmica conformacional da E1 helicase de papillomavirus na interação com ligantes, bem como, prever a interação do composto nº 9 derivado do ácido bifenilsulfonacético com esta proteína.

MATERIAL E MÉTODOS

Modelagem comparativa

Para a construção dos modelos tridimensionais das estruturas da E1 helicase dos HPV6, HPV11 e HPV16 foi utilizado o web server de modelagem comparativa Geno3D ([HTTP://geno3D-pbil.ibcp.fr](http://geno3D-pbil.ibcp.fr)). Inicialmente a modelagem comparativa foi realizada utilizando a estrutura do HPV18 (PDB ID 1TUE), que se encontra depositada no PDB (Protein Data Bank). Depois, a cadeia A e em seguida, a cadeia B da estrutura hexamérica do BPV1 (PDB ID 2GXA) foram utilizadas a fim de determinação dos modelos do 3D dos HPV6, HPV11 e HPV16.

Docking molecular

Os estudos de docking ligante-receptor foram feitos utilizando o programa AUTODOCK 4.2 (Morris, Goodsell et al. 1998). As estruturas tridimensionais dos HPV6, HPV11 e HPV16, derivadas da modelagem comparativa a partir dos moldes de HPV18 (PDB ID 1TUE) e das cadeias

A e B do BPV1 (2GXA) foram utilizadas no estudo de docking. No presente estudo, os receptores (HPV6, HPV11, HPV16, HPV18 e BPV1) foram tratados como rígidos e apenas as flexibilidades dos ligantes [ADP e o inibidor nº 9 derivado do ácido bifenilsulfonacético (White, 2005)] foram consideradas (Tabela 1).

Dinâmica molecular

O sistema inicial foi construído a partir das coordenadas da proteína E1 de HPV18 (PDB ID 1TUE). A molécula da proteína foi colocada no centro de uma caixa cúbica de aresta igual a 9.4 nm, onde foram adicionadas 25.916 moléculas de água. Para manter a eletroneutralidade do sistema, dois íons Cl⁻ foram posteriormente adicionados ao sistema através da substituição de duas moléculas de água previamente existentes. O sistema final contendo um total de 79.910 átomos foi submetido a uma otimização de geometria até atingir um gradiente de energia abaixo de 200 kJ/mol. Os cálculos de dinâmica molecular foram realizados utilizando-se o campo de força do GROMOS 53A6 (Oostenbrink, Soares et al. 2005) conjuntamente com o programa GROMACS (Van der Spoel, Lindahl et al. 2005; Hess, Kutzner et al. 2008). Os potenciais do modelo SPC (Berendsen, Grigera et al. 1987) foram utilizados para descrição das moléculas de água. As simulações foram realizadas no ensemble NpT utilizando o termostato de Berendsen (Berendsen, Postma et al. 1984), a uma temperatura de 300 K e tempo de relaxação de 0.1 ps. A pressão de 1 bar foi mantida através de escalonamento isotrópico fraco das coordenadas e compressibilidade de 4.5×10^{-5} kJ/mol/nm³ utilizando o barostato de Berendsen (Berendsen, Postma et al. 1984). Condições periódicas de contorno foram usadas com um raio de corte de 1.4 nm para as interações entre termos não ligados. Correções das interações eletrostáticas de longo alcance foram realizadas através do método de campo de reação generalizado (Tironi, Sperb et al. 1995). O algoritmo LINCS (Hess, Bekker et al. 1997) foi aplicado a todas as ligações químicas envolvendo átomos de hidrogênio com um passo de integração de 2 fs. As equações de movimento de Newton foram integradas através do algoritmo de leapfrog (Hockney 1970). As análises dos dados foram realizadas utilizando sub-rotinas de pós-processamento de trajetórias moleculares distribuídas juntamente com o programa GROMACS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alinhamento e modelagem comparativa

As sequências primárias da E1 helicase dos HPV6, HPV11 e HPV16 foram alinhadas com as proteínas-molde de E1 helicase de HPV18 (1TUE) e E1 helicase de BPV1 (PDB ID 2GXA – cadeias A e B). A alta identidade entre as sequências primárias das proteínas em questão permitiu a geração de modelos tridimensionais da E1 helicase usando a estratégia de modelagem molecular

por homologia. Os valores de RMSD (root mean square deviation) obtidos foram tão satisfatórios quanto se tivéssemos comparando estruturas de proteínas idênticas em diferentes formas cristalinas (Tabelas 2, 3 e 4). A qualidade dos modelos gerados foi avaliada pela observação do gráfico de Ramachandran. Os 202 resíduos de aminoácidos da E1 helicase dos HPVs estudados que foram submetidos à modelagem comparativa (a partir da estrutura cristalográfica da cadeia B do 2GXA), apresentaram a seguinte distribuição no gráfico de Ramachandran: 100% dos resíduos de aminoácidos de HPV6 se encontram em regiões permitidas; nos HPV11 e HPV18, 98.9% dos resíduos estão em regiões permitidas; e para o HPV16, 97.8% desses resíduos se encontram em regiões permitidas (Figura 1).

Docking molecular

Estudos mutacionais prévios (White, Faucher et al. 2005) indicam que o resíduo de aminoácido Y 486 de HPV6 favorece a ligação de inibidores do ácido bifenilsulfonacético e contribui para a inibição da atividade ATPase da proteína E1 helicase. Assim, esse experimento teórico tem a finalidade de avaliar a região de associação dos compostos derivados do ácido bifenilsulfonacético. Desse modo, nos estudos de docking realizados, o gridbox (caixa reticulada) foi centrado no átomo de nitrogênio da carbonila da Y486 (ou aminoácido correspondente) a fim de direcionar o ligante ao seu sítio de ligação. O inibidor nº 9 derivado do ácido bifenilsulfonacético foi utilizado como sistema modelo, uma vez que este inibidor é apontado na literatura como um agente eficaz na inibição da atividade ATPase da E1 helicase de HPV (White, Faucher et al. 2005). Primeiramente, foram realizados estudos de docking utilizando as proteínas modeladas a partir da E1 helicase de HPV18 (1TUE) e da cadeia A da E1 helicase de BPV1 (2GXA). Esses dockings não obtiveram êxito, uma vez que a ligação de ambos os ligantes ocorreram longe do sítio de ligação esperado. Contudo, utilizando-se a cadeia B da estrutura 2GXA, a qual possui o P-loop numa conformação mais aberta, foi possível reproduzir a geometria experimental de ligação do ADP a proteína de BPV (Tabela 5). Tal êxito proporciona confiabilidade para se avaliar a ligação de potenciais compostos inibidores a esta estrutura. Assim, para cada complexo ligante-receptor, foram geradas 250 conformações. O critério de escolha do melhor cluster foi o da população. Dentro deste cluster, a conformação com a menor energia de ligação foi selecionada (Figura 2). Contrastando com a hipótese de White (2005), a ligação do inibidor nº 9 à estrutura de E1 helicase ocorre no sítio de ligação do ATP. O modo de ligação preferencial revela uma conformação onde a molécula de ADP interage com os resíduos de aminoácidos K439 e Y441 (Figura 3). Esses achados colocam esses resíduos como importantes alvos candidatos para o desenvolvimento de estratégias baseadas em inibidores de E1. Vale salientar que a energia de ligação da E1 helicase com o inibidor nº 9 é menor que a energia de ligação estimada para a ligação do ATP neste sítio (Tabela 5). Ainda, as

conformações resultantes dos clusters 1 e 2 do docking do BPV com o inibidor nº 9 são muito similares conformacionalmente e energeticamente. Desse modo, se estas conformações forem agrupadas, o número total de indivíduos do cluster poderá duplicar e alcançar um número de conformações no cluster semelhante à observada na interação da E1 helicase de BPV com o ADP (Figura 4). Portanto, esses resultados indicam um mecanismo de inibição competitiva.

Os resultados da modelagem de E1 dos HPVs baseada na cadeia B do 2GXA (P-loop na conformação mais aberta) foram menos promissores, uma vez que, os valores de energia bem como o tamanho dos clusters das ligações preditas mostraram sucesso limitado. Contudo, foram observados modos de ligação similares ao ADP no BPV; diferentemente de quando foram usados os modelos derivados das coordenadas da estrutura cristalográfica do HPV18 (1TUE) e da cadeia A do 2GXA. Ainda, as médias de energia na ligação tanto do ADP como do inibidor nº 9 foram muito próximas indicando que a ligação ao sítio ATPase será do ligante que tiver a maior concentração. Esses achados sugerem que não somente a conformação do P-loop tem um papel na inibição da ligação no sítio do ATP, mas também que a dinâmica conformacional dos resíduos que ocupam o sítio de ligação ao ATP são importantes para descrever propriamente as interações entre ligantes e essas proteínas quando no desenvolvimento de estratégias de desenho de fármacos. Assim sendo, simulações de dinâmica molecular foram realizadas para verificar tal hipótese.

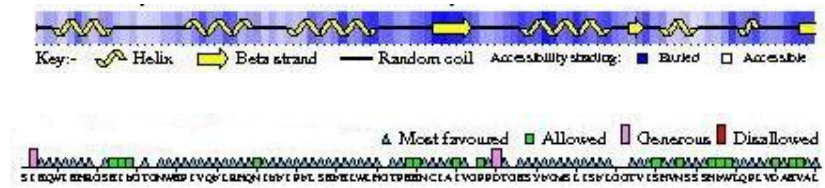
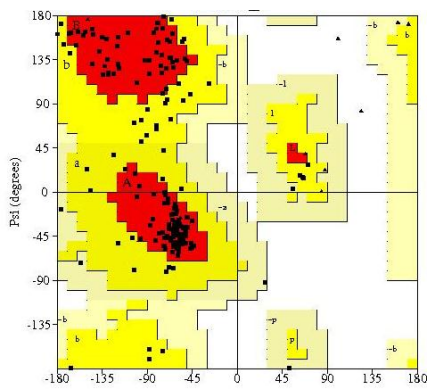
Dinâmica molecular

As análises das propriedades moleculares podem fornecer uma idéia de como várias partes instáveis do sistema molecular variam com o tempo. Para o estudo de dinâmica molecular, a estrutura cristalográfica da proteína E1 helicase de HPV18 (1TUE) (Abbate, Berger et al. 2004) foi utilizada. Os resíduos identificados no HPV6 como K484 e Y486 correspondem, respectivamente, a K66 e Y68 neste estudo. O cálculo do RMSF permitiu visualizar as regiões flexíveis do sistema. A flutuação dos resíduos mostra satisfatória estabilidade durante a simulação de dinâmica molecular, além disso, foram verificadas flexibilidade entre os resíduos de aminoácidos 59-65, 80-91, 105-112, 128-138, 150-155, 173-180 (Figura 5). A flexibilidade entre os resíduos de aminoácidos 59-65 era esperada, uma vez que é nesta região que está localizado o P-loop. As demais regiões são regiões que se encontram em contato com outro monômero na estrutura cristalográfica e assim teve a sua flexibilidade aumentada devido solvatação. A folha- β localizada entre os aminoácidos 173 -180 tende a se desestabilizar durante a simulação e a sua estabilização deve estar relacionada com a interação com outro monômero do complexo cristalográfico. Já a folha- β compreendida entre os aminoácidos 128-138 apresenta uma grande flexibilidade, entretanto, é estável durante a simulação (Figuras 5 e 6). Para ratificar a hipótese de que um rearranjo conformacional dos resíduos localizados no sítio ATPase é fundamental para o acoplamento correto de ligantes foram realizadas

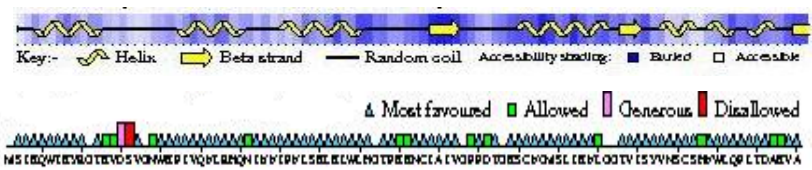
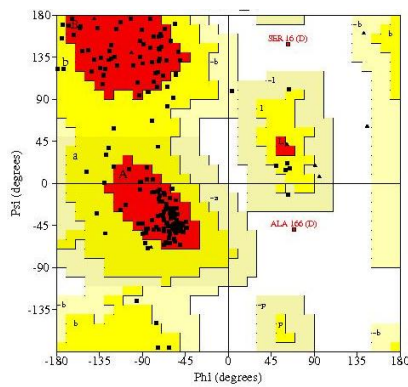
medidas de distância entre esses resíduos. O mapa de contato dos carbonos α dos aminoácidos da E1 helicase de HPV18 não registrou grandes variações na distância média entre os aminoácidos no início (0-10 ns) e no final da simulação (40-50 ns) (Figura 7). Desse modo, podemos afirmar que a topologia da proteína não modificou durante a simulação, ou seja, apesar da flexibilidade, a estrutura terciária da proteína não sofreu mudanças drásticas confirmando assim a estabilidade do monômero. No gráfico de Ramachandran do Y68 pode-se verificar que a sua cadeia lateral pode assumir quatro conformações preferenciais diferentes (Figura 8). Esse achado corrobora a hipótese do induced fit necessário para o acoplamento de ligantes no sítio ATPase. Também foi possível verificar o aumento da distância entre os resíduos de aminoácidos A62 e S67 no final da simulação de dinâmica molecular (Figura 9). O tamanho da distância entre os resíduos de aminoácidos K66 e S67 foi calculado e vimos que há a formação e a ruptura da ponte de hidrogênio entre os mesmos durante a simulação (Figura 10).

Assim sendo, a flexibilidade do P-loop e o rearranjo conformacional (*induced fit*) dos resíduos de aminoácidos A62, K66, S67 e Y68 localizados no sítio de ATPase esclarece as diferenças na afinidade da inibição do composto nº 9 derivado do ácido bifenilsulfonacético observadas experimentalmente nos HPV6, 11 e 18. Desse modo, o planejamento de fármacos para a E1 helicase deverá levar em consideração tais mobilidades da proteína e sendo assim, é provável que para a inibição da atividade ATPase da referida proteína seja necessária não somente um único fármaco, mas uma série de diferentes fármacos possam atuar nas diferentes formas apresentadas por esta proteína.

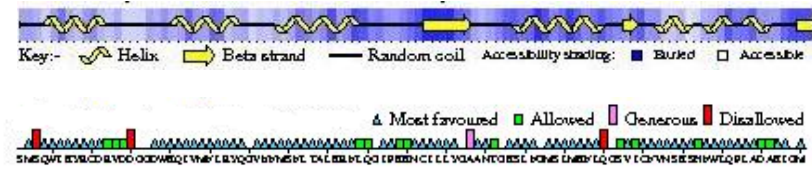
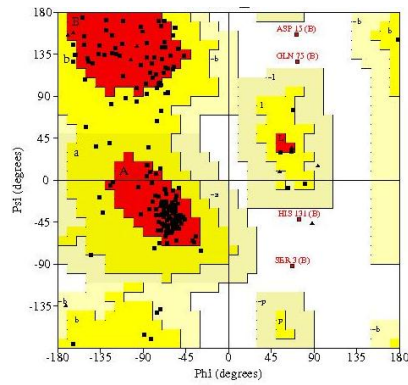
a)



b)



c)



d)

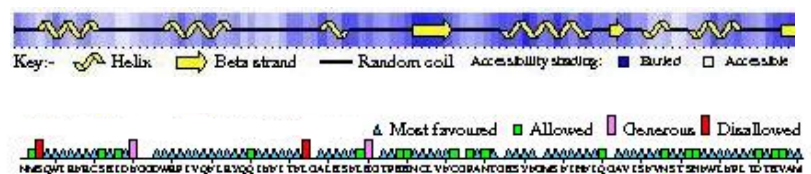
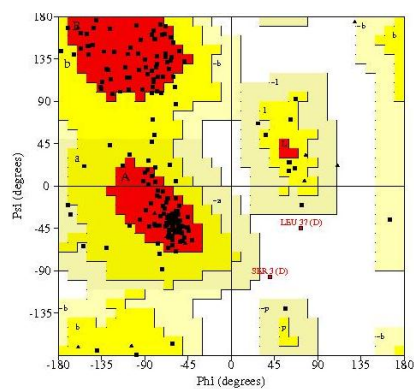
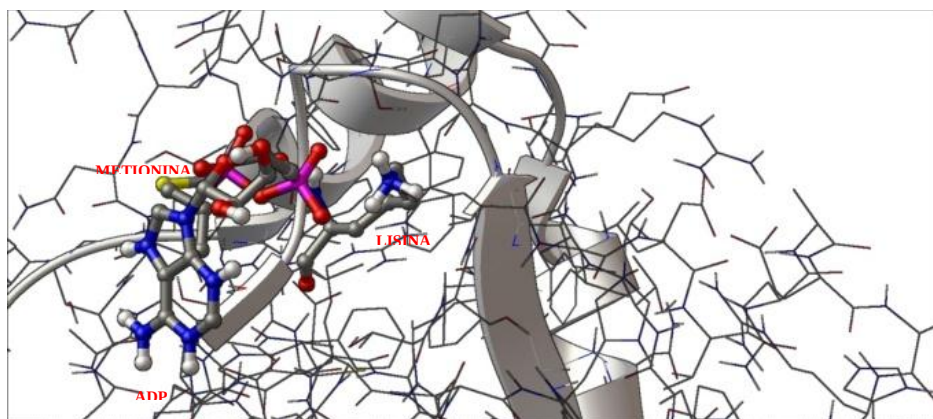
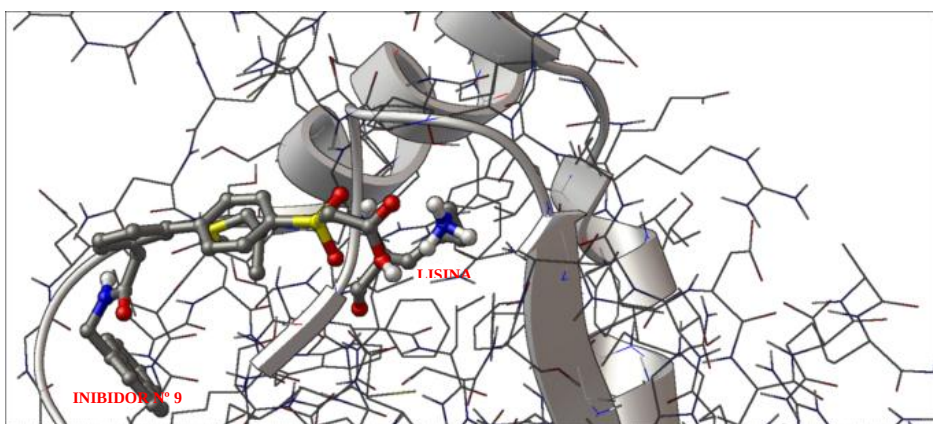


Figura 1. Gráfico de Ramachandran das estruturas tridimensionais da E1 helicase de HPV6 (a), HPV11 (b), HPV16 (c) e HPV18 (d) modeladas a partir do 2GXA (cadeia B). Ao lado do gráfico de Ramachandran a relação entre as sequências primárias e secundárias e a localização dos resíduos no gráfico. As regiões mais favoráveis do gráfico estão em vermelho. Regiões permitidas, generosamente permitidas e não permitidas estão indicadas nas cores amarelo escuro, amarelo claro e branco, respectivamente.

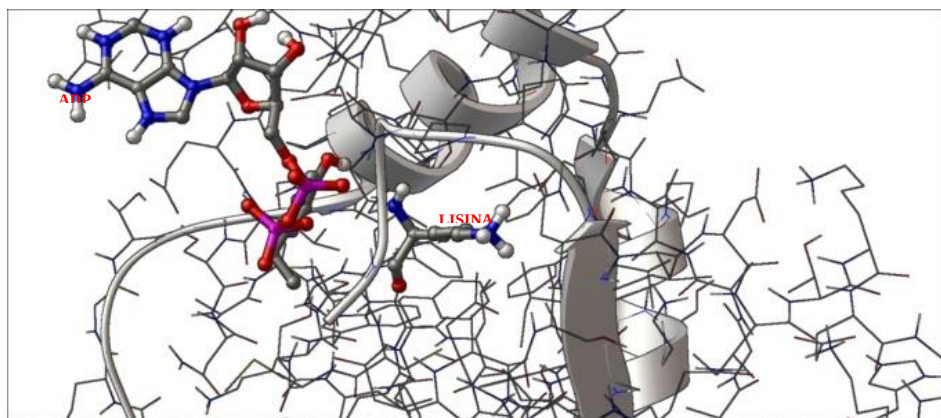
a)



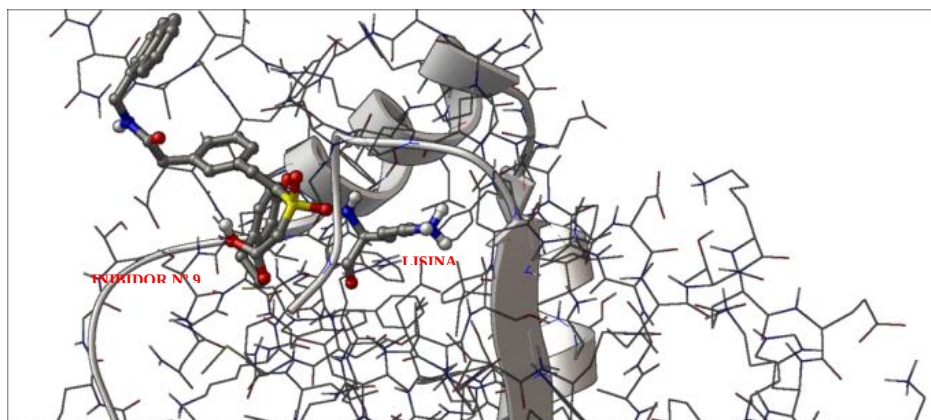
b)



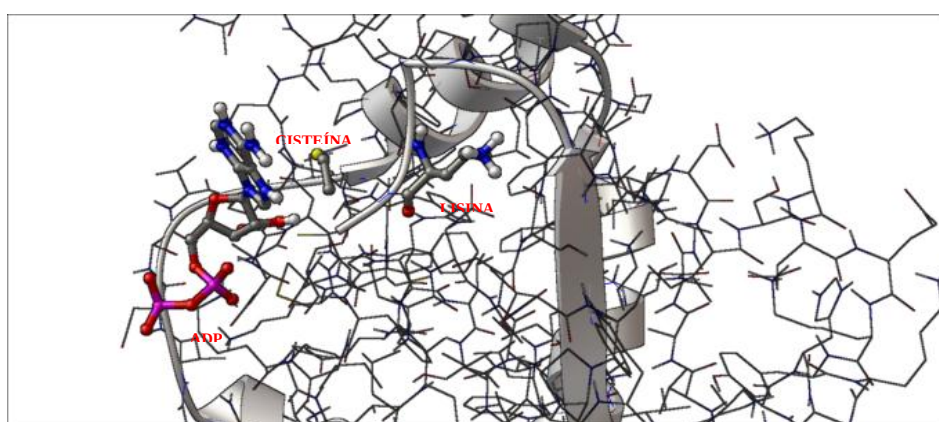
c)



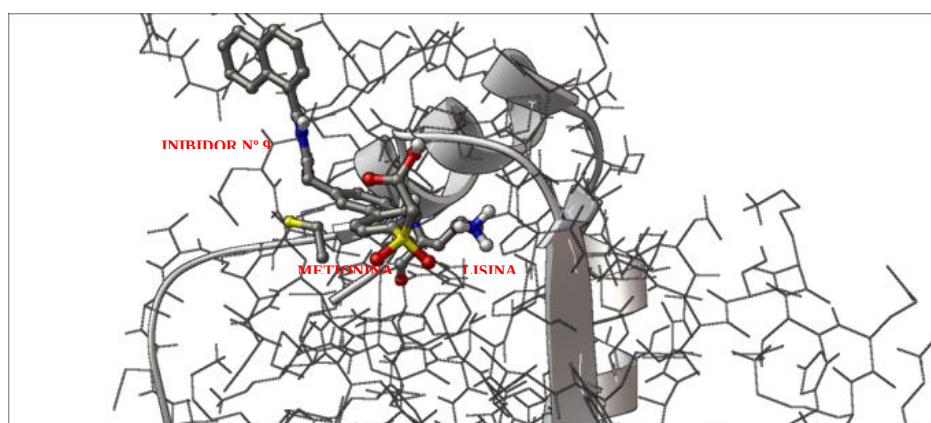
d)



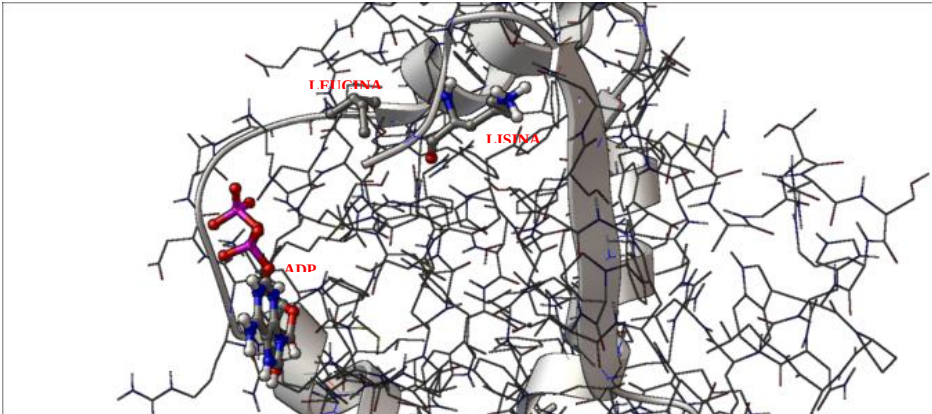
e)



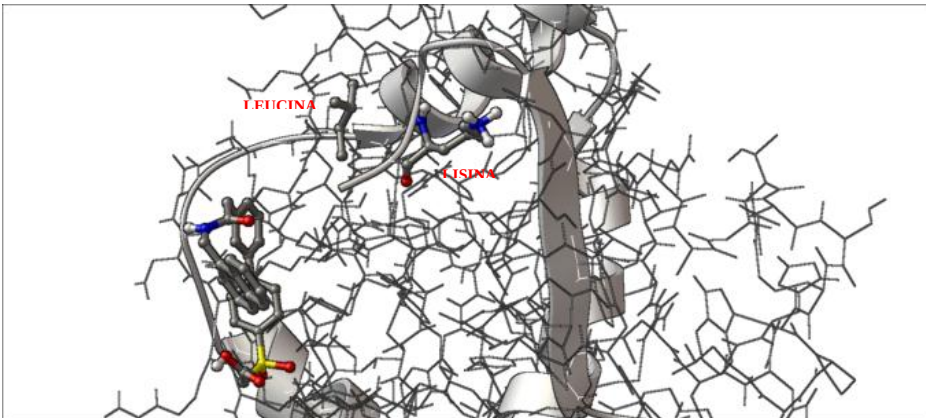
f)



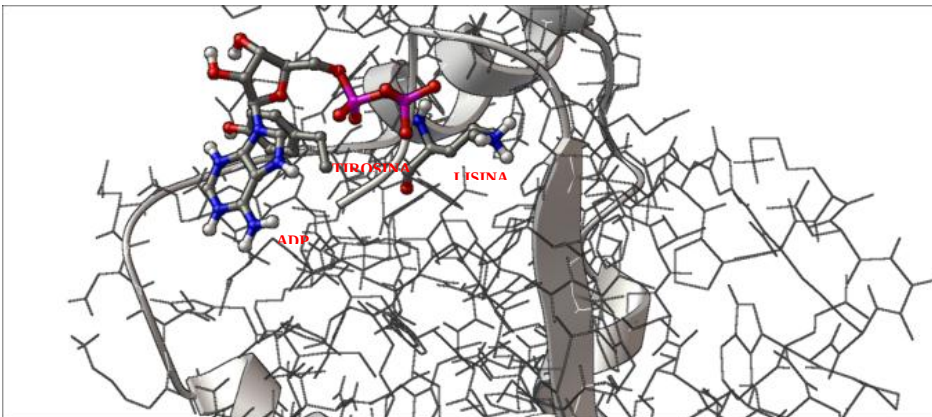
g)



h)



i)



j)

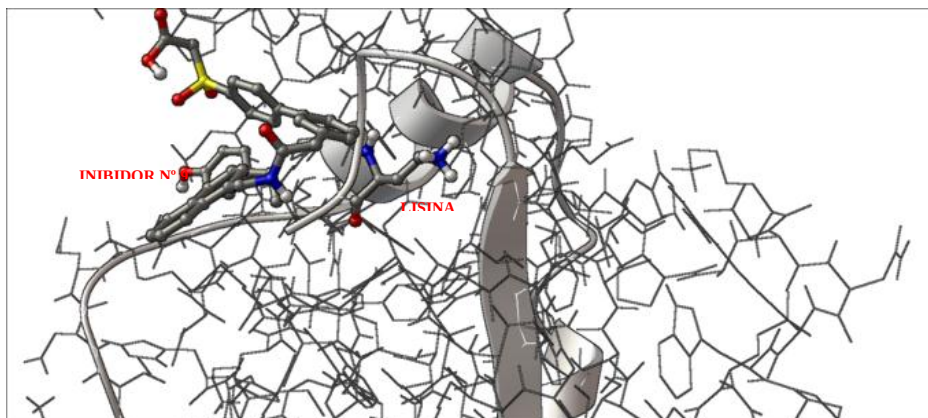
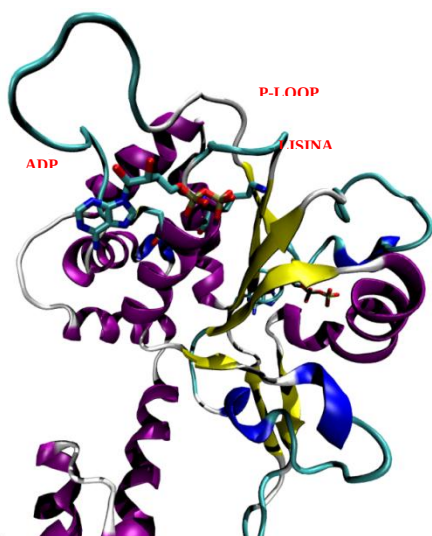


Figura 2. Conformações de menor energia obtidas no docking molecular. O modo de ligação preferencial revela uma conformação onde os ligantes interagem com os resíduos de aminoácidos K439 e Y441 (ou correspondentes). a)ADP-2GXA; b)INIBIDOR N°9-2GXA; c)ADP-HPV6; d)INIBIDOR N°9-HPV6; e)ADP-HPV11; f)INIBIDOR N°9-HPV11; g)ADP-HPV16; h)INIBIDOR N°9-HPV16; i)ADP-HPV18; INIBIDOR N°9-HPV18.

a)



b)

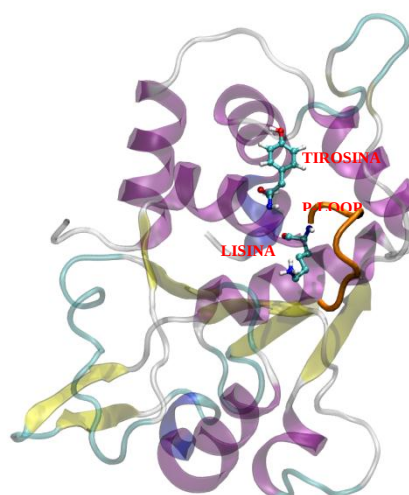


Figura 3. a) Monômero de E1 helicase de BPV1 do complexo hexamérico 2GXA. A molécula de ADP interage com os resíduos de aminoácidos K439 e M441 que estão situados próximos ao P-loop. b) Monômero de E1 helicase de HPV18 evidenciando os resíduos K66 e Y68 (resíduos equivalentes a K439 e M441 de BPV1) e o P-loop.

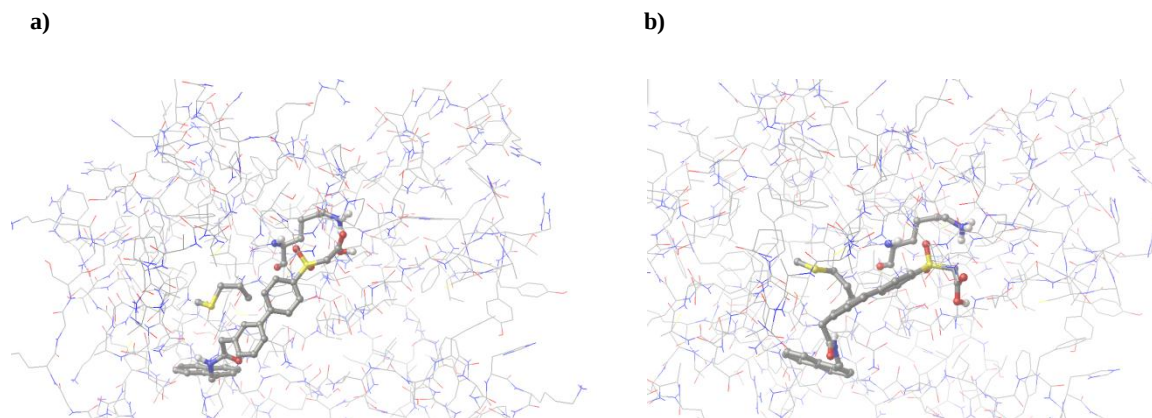


Figura 4. Conformações de menor energia dos clusters 1 (a) e 2 (b) do docking molecular do inibidor nº 9 com o BPV1. Os clusters apresentaram a mesma população (15 conformações), energias médias semelhantes e ligaram-se ao sítio ATPase de maneira similar. K439, M441 e o inibidor nº 9 estão representados em destaque.

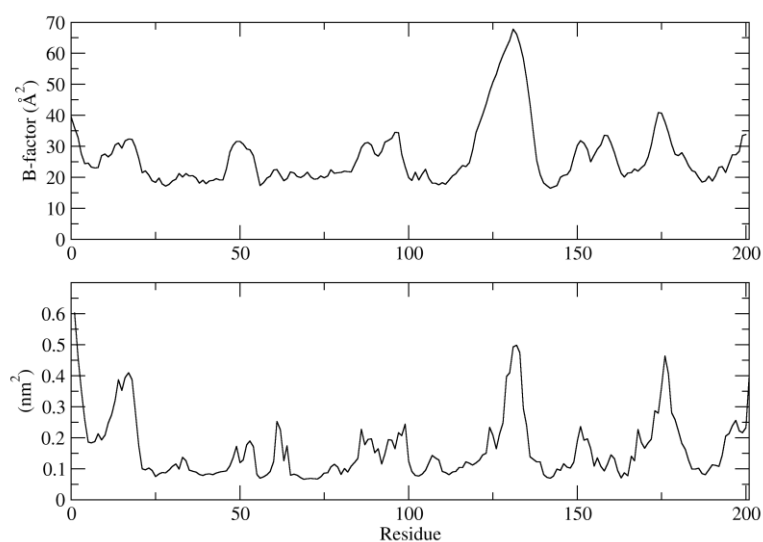


Figura 5. B-factor da estrutura cristalográfica de E1 helicase de HPV18 (acima) e flutuação da estrutura modelada de HPV18 (abaixo). As regiões de flexibilidade são correspondentes nas duas estruturas. A estrutura modelada apresenta diferenças apenas na intensidade das flutuações. Esta diferenciação pode ser explicada uma vez que a estrutura modelada está sob a forma de monômero em água.

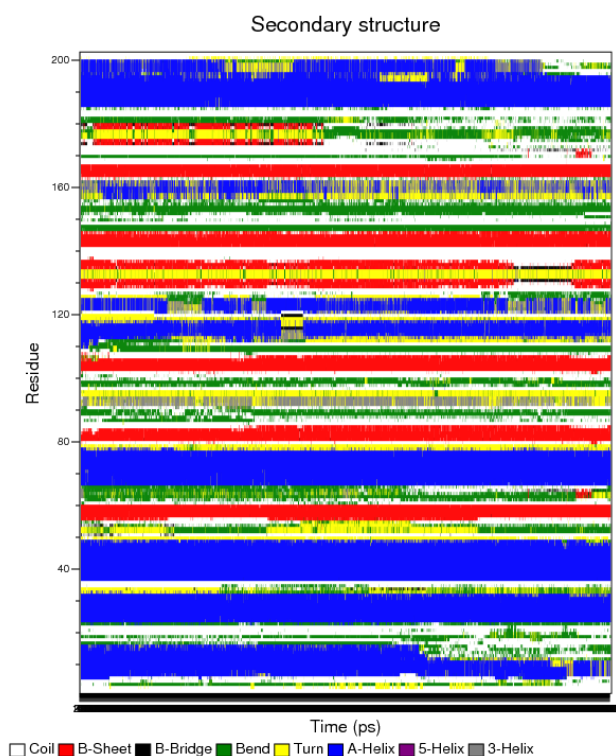


Figura 6. Variação da estrutura secundária da proteína E1 helicase de HPV18 durante a simulação de dinâmica molecular (0-50 ns).

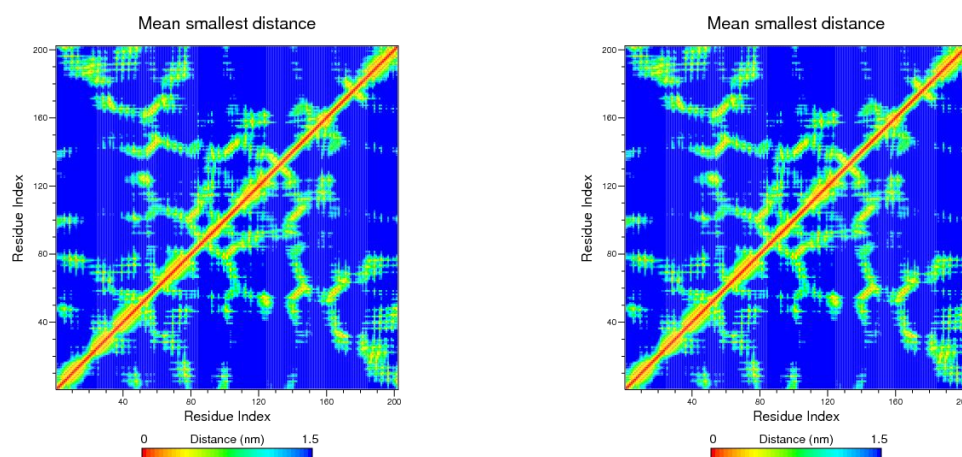


Figura 7. Mapa de contato dos carbonos α dos aminoácidos da E1 helicase de HPV18 no início (0-10 ns) e no final (40-50 ns) da simulação.

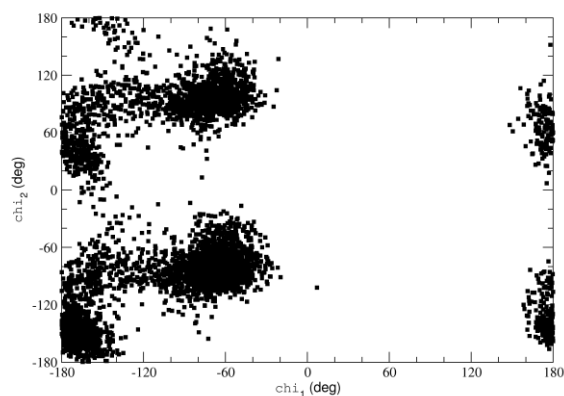
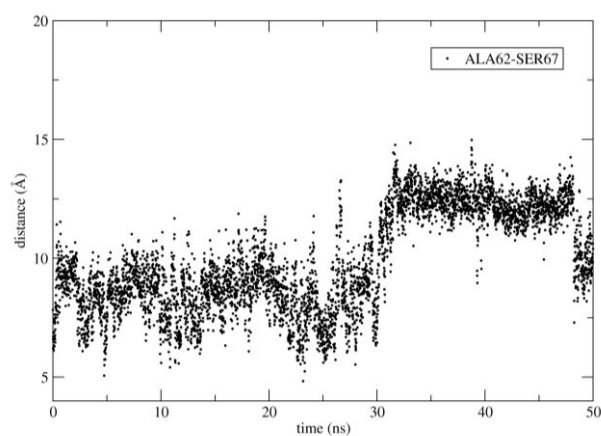


Figura 8. Deslocamentos de dos ângulos χ_1 e χ_2 de Y68 durante a simulação de dinâmica molecular. Durante a simulação Y68 pode assumir até quatro conformações diferentes.

a)



b)

c)

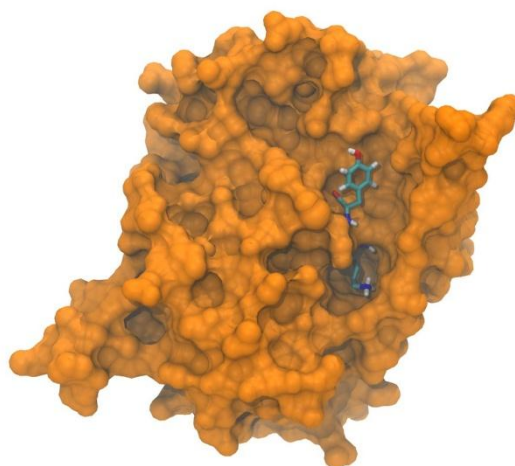
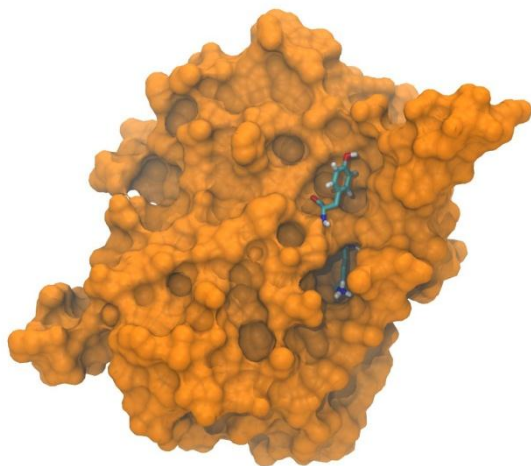
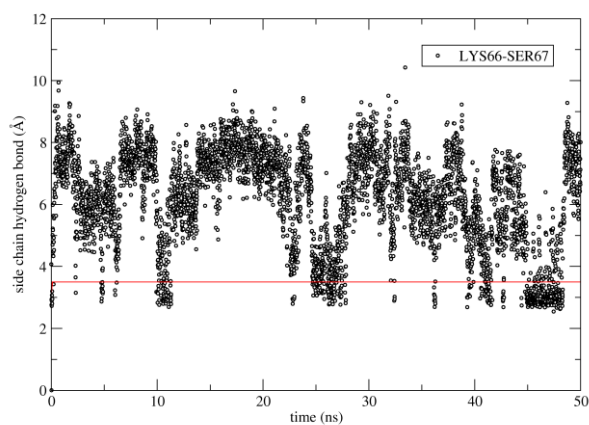
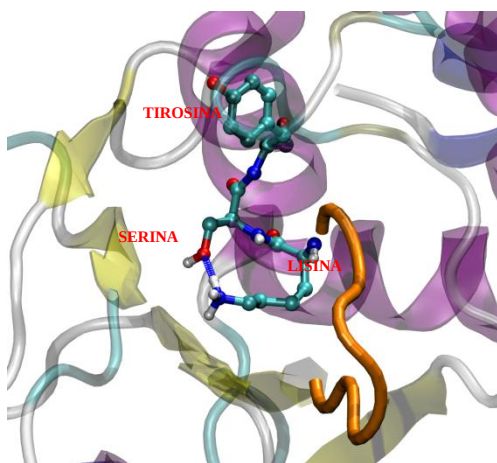


Figura 9. Distância entre os resíduos A62 e S67 (a). A distância ilustra o fechamento (b) e a abertura (c) do P-loop sobre o sítio de ligação do ATP.

a)



b)



c)

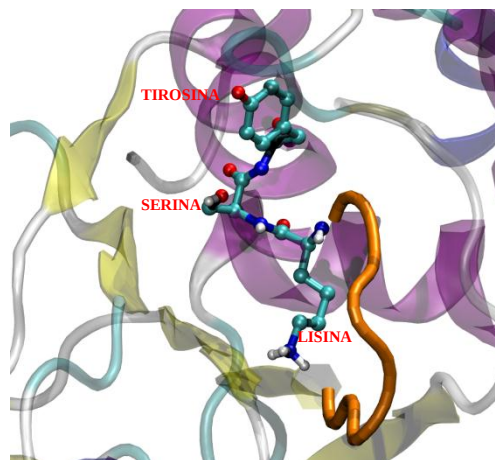


Figura 10. a) Interações entre as cadeias laterais de K66 e S67 durante a dinâmica molecular. A distância de 3.5 Å, referência padrão para a existência de pontes de hidrogênio, está representada por uma linha vermelha. b) visualização da formação da ponte de hidrogênio entre K66 e S67 e a ruptura desta ponte de hidrogênio (c).

Tabela 1. Tipos de dockings realizados entre a E1 helicase de papillomavirus com os ligantes ADP e o inibidor nº 9.

LIGANTE	PROTEÍNA	MODELO PARA MODELAGEM COMPARATIVA
ADP	E1 helicase de HPV6	1TUE
ADP	E1 helicase de HPV11	1TUE
ADP	E1 helicase de HPV16	1TUE
ADP	1TUE (Abbate, Berger et al. 2004)	-
ADP	2GXA (Enemark and Joshua-Tor 2006)	-
ADP	E1 helicase de HPV6	2GXA (cadeia A)
ADP	E1 helicase de HPV11	2GXA (cadeia A)
ADP	E1 helicase de HPV16	2GXA (cadeia A)
ADP	E1 helicase de HPV18	2GXA (cadeia A)
ADP	E1 helicase de HPV6	2GXA (cadeia B)
ADP	E1 helicase de HPV11	2GXA (cadeia B)
ADP	E1 helicase de HPV16	2GXA (cadeia B)
ADP	E1 helicase de HPV18	2GXA (cadeia B)
Inibidor nº 9	E1 helicase de HPV6	1TUE
Inibidor nº 9	E1 helicase de HPV11	1TUE
Inibidor nº 9	E1 helicase de HPV16	1TUE
Inibidor nº 9	1TUE	-
Inibidor nº 9	2GXA (cadeia A)	-
Inibidor nº 9	E1 helicase de HPV6	2GXA (cadeia A)
Inibidor nº 9	E1 helicase de HPV11	2GXA (cadeia A)
Inibidor nº 9	E1 helicase de HPV16	2GXA (cadeia A)
Inibidor nº 9	E1 helicase de HPV18	2GXA (cadeia A)
Inibidor nº 9	E1 helicase de HPV6	2GXA (cadeia B)
Inibidor nº 9	E1 helicase de HPV11	2GXA (cadeia B)
Inibidor nº 9	E1 helicase de HPV16	2GXA (cadeia B)
Inibidor nº 9	E1 helicase de HPV18	2GXA (cadeia B)

Tabela 2. Identidade (%) entre as sequências primárias e RMSD (Å) entre as estruturas tridimensionais da E1 helicase dos HPV6, 11 e 16 e a E1 helicase de HPV18 (1TUE).

	IDENTIDADE (%) 1TUE	RMSD (Å)
HPV6	62	0,78
HPV11	63	0,76
HPV16	66	0,68

Tabela 3. Identidade (%) entre as sequências primárias e RMSD (Å) entre as estruturas tridimensionais da E1 helicase dos HPV6, HPV11, HPV16 e HPV18 e a E1 helicase de BPV1 (2GXA – cadeia A).

	IDENTIDADE (%) 2GXA (A)	RMSD (Å)
HPV6	53	0,90
HPV11	53	0,85
HPV16	50	0,84
HPV18	52	0,91

Tabela 4. Identidade (%) entre as sequências primárias e RMSD (Å) entre as estruturas tridimensionais da E1 helicase dos HPV6, HPV11, HPV16 e HPV18 e a E1 helicase de BPV1 (2GXA – cadeia B).

	IDENTIDADE (%)2GXA (B)	RMSD (Å)
HPV6	53	0,92
HPV11	53	0,85
HPV16	50	0,87
HPV18	52	0,85

Tabela 5. Lista dos *dockings* entre a proteína E1 helicase de PVs e os ligantes ADP e inibidor nº 9.

Ligante	Proteína	Conformação esperada	Tamanho do cluster	Média de energia	Energia mínima	Ki (µM)
ADP	2GXA (cadeia B)	+	24	-5.01	-6.16	30.6
ADP	HPV6	-	20 ^a	-2.79	-4.13	932.85

ADP	HPV11	+	16	-2.66	-3.49	2.75
ADP	HPV16	+	8	-2.53	-3.43	3.06
ADP	HPV18	+	14	-2.54	-3.84	1.52
Inibidor nº 9	2GXA (cadeia B)	+	15 ^a /30 ^b	-5.63	-7.51	3.15
Inibidor nº 9	HPV6	-	7	-3.80	-4.19	851.02
Inibidor nº 9	HPV11	+	13	-5.10	-6.39	20.56
Inibidor nº 9	HPV16	+	10	-4.30	-5.33	124.57
Inibidor nº 9	HPV18	+	14	-3.85	-4.79	306.02

^a Além de ser o cluster com maior população também é o de menor energia; ^b Se for considerado o somatório dos clusters 1 e 2, os quais possuem 15 indivíduos cada.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbate, E. A., J. M. Berger, et al. (2004). "The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2." *Genes Dev* **18**(16): 1981-1996.
- Berendsen, H. J. C., J. R. Grigera, et al. (1987). "The Missing Term in Effective Pair Potentials." *Journal of Physical Chemistry* **91**(24): 6269-6271.
- Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, et al. (1984). "Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath." *Journal of Chemical Physics* **81**(8): 3684-3690.
- Bernard, H.-U., R. D. Burk, et al. (2010). "Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments." *Virology* **401**: 70-79.
- Bodily, J. and L. A. Laimins (2010). "Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression." *TRENDS in Microbiology*.
- Enemark, E. J. and L. Joshua-Tor (2006). "Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase." *Nature* **442**(7100): 270-275.
- Frick, D. N. (2003). "Helicases as antiviral drug targets." *Drug News Perspect* **16**(6): 355-362.
- Hess, B., H. Bekker, et al. (1997). "LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations." *Journal of Computational Chemistry* **18**(12): 1463-1472.
- Hess, B., C. Kutzner, et al. (2008). "GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation." *Journal of Chemical Theory and Computation* **4**(3): 435-447.
- Hockney, R. W. (1970). "The potential calculation and some applications." *Methods Comput Phys* **9**: 136-211.
- INCA (2006). Estimativas de Incidência para o Câncer de Colo Uterino para o ano de 2006. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde/ Instituto Nacional do Câncer
- INCA (2009). Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer: 98.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2006). "Cancer statistics, 2006." *CA Cancer J Clin* **56**(2): 106-130.
- Keam, S. J. and D. M. Harper (2008). "Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]." *Drugs* **68**(3): 359-372.
- Markowitz, L. E. (2007). "Quadrivalent human papillomavirus vaccine: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP)." *MMWR Recomm Rep* **56**: 1-24.

- Morris, G. M., D. S. Goodsell, et al. (1998). "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. , 19: . doi: ." Journal of Computational Chemistry **19**: 1639–1662.
- Oostenbrink, C., T. A. Soares, et al. (2005). "Validation of the 53A6 GROMOS force field." European Biophysics Journal with Biophysics Letters **34**(4): 273-284.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Phelps, W. C., J. A. Barnes, et al. (1998). "Molecular targets for human papillomaviruses: prospects for antiviral therapy." Antivir Chem Chemother **9**(5): 359-377.
- Shi, L., H. L. Sings, et al. (2007). "GARDASIL: prophylactic human papillomavirus vaccine development--from bench top to bed-side." Clinical pharmacology and therapeutics **81**(2): 259-264.
- Sterlinko Grm, H. and L. Banks (2004). "HPV proteins as targets for therapeutic intervention." Antivir Ther **9**(5): 665-678.
- Tironi, I. G., R. Sperb, et al. (1995). "A generalized reaction field method for molecular-dynamics simulation." Journal of Chemical Physics **102**(13): 5451-5459.
- Tristram, A. and A. Fiander (2007). "Human papillomavirus (including vaccines)." OBSTETRICS, GYNAECOLOGY AND REPRODUCTIVE MEDICINE **17**(11): 324-329.
- Van der Spoel, D., E. Lindahl, et al. (2005). "GROMACS: Fast, flexible, and free." Journal of Computational Chemistry **26**(16): 1701-1718.
- White, P. W., A. M. Faucher, et al. (2005). "Biphenylsulfonacetic acid inhibitors of the human papillomavirus type 6 E1 helicase inhibit ATP hydrolysis by an allosteric mechanism involving tyrosine 486." Antimicrob Agents Chemother **49**(12): 4834-4842.
- zur Hausen, H. (2009). "Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account." Virology **384**(2): 260-265.

7. CONCLUSÕES

A proteína E1 de HPV é um importante alvo para o desenho de fármacos inibidores de HPV. O desenho de um fármaco inibidor que bloqueie a atividade ATPase da E1 acarretaria possivelmente na perda da capacidade da replicação viral. Diferentemente das vacinas profiláticas disponíveis atualmente, um fármaco que seja capaz de inibir a E1 de HPV terá aplicações nos pacientes já infectados pelo vírus acarretando possivelmente numa diminuição dos casos de câncer de colo uterino. Os resultados deste trabalho poderão auxiliar em estudos posteriores que visem à utilização da proteína E1 de HPV como alvo terapêutico, uma vez que, nos possibilita as seguintes conclusões:

- A partir da estrutura cristalográfica da cadeia B da proteína E1 helicase de BPV1 (PDB ID = 2GXA) foi possível prever as estruturas tridimensionais da porção E1 helicase das proteínas dos HPVs tipos 6, 11 e 16 usando a modelagem comparativa.

- Os estudos de docking molecular esclareceram que o inibidor nº 9 derivado do ácido bifenilsulfonacético e o ATP competem pelo mesmo sítio de ligação na E1 helicase de HPV, e desse modo, a ligação dependerá da concentração do inibidor.
- As simulações de dinâmica molecular foram utilizadas para estudar o comportamento do monômero da proteína E1 helicase de HPV18. Os resultados destas simulações indicam que possivelmente seja necessária a utilização de mais de um tipo de fármaco para conter a atividade desta proteína, haja vista a flexibilidade do P-loop e o rearranjo conformacional (*induced fit*) dos resíduos de aminoácidos localizados no sítio de ATPase.

8. ANEXOS

Anexo 1

Lista dos códigos identificadores dos aminoácidos

Aminoácido	3 Letras	1 Letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido Glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Anexo 2

ARTIGO 2

1. TÍTULO: Human Papillomavirus Infection through the Human Body (review)
2. AUTORES: Monique Ferraz de Sá Beltrão, Vilma Guimarães de Mendonça, Nataly Amorim de Santana, José Luiz de Lima Filho, Danyelly Bruneska
3. REVISTA: International Journal of Infectious Diseases (impact factor 2.167)
4. SITUAÇÃO: Submetido

HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION THROUGH THE HUMAN BODY

Monique Ferraz de Sá Beltrão^{1,2}, Vilma Guimarães de Mendonça³, Nataly Amorim de Santana^{1,2},
José Luiz de Lima Filho^{1,2,4}, Danyelly Bruneska^{1,2,4,*}

¹ Molecular Prospection and Bioinformatics Group (ProspecMol), Laboratory of Immunopatology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – Recife – PE, Brasil.

² Laboratory of Immunopatology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco – Recife – PE, Brasil.

³ Integral Institut of Medicine Prof. Fernando Figueira – Recife – PE, Brasil.

⁴ Departament of Biochemistry - Federal University of Pernambuco – Recife – PE, Brasil.

*** Corresponding:**

Molecular Biology Sector

Laboratory of Immunopatology Keizo Asami (LIKA)

Federal University of Pernambuco (UFPE)

Campus Universitário, Cidade Universitária

Recife - PE - Brasil

CEP: 50670-901

Phone: + 55 81 2126 8484

Fax: + 55 81 2126 8485

e-mail: bruneska@prospecmol.org

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is currently a clinically important virus in view of the highest number of lesions that it causes at different sites of the human body. The diagnosis of HPV infection should be made based on visual inspection of characteristic clinical signs and laboratory tests. Organs of the genital tract are more common sites where this virus can be found, but with the increasing the sensitivity of diagnostic technique, it is possible to identify viral presence in different regions of the body such as tissues of the digestive, respiratory and urinary tracts. These findings demonstrate that HPV is able to infect various cells, tissues and organs. The widespread presence of the virus in the human body, often in latent form, led us to consider the hypothesis that human papilloma virus latency may be associated with no disease, which opens questions about the chance of this virus not causing disease in specific sites of the human body, but rather behaving like a symbiotic microorganism.

Keywords: Human papillomavirus; viral dissemination; neoplasia; condyloma; warts; cervical cancer.

INTRODUCTION

Viral infections, such as those caused by HIV, HCV, Ebola, and others constitute a public health problem worldwide, especially in developing countries. Papillomaviruses (PVs) are currently represented by 189 genotypes of which 120 were isolated from humans¹. They are divided into 16 PVs genera², and alpha-papillomavirus is considered the most clinically important genus as it includes the largest number of HPV that cause lesions. HPV types can be broadly grouped according to the degree of cell damage that they are able to cause, resulting in high or low risk³. Additionally, they can be described as cutaneous types or mucosotropic types based on their tissue tropism⁴. The aim of this review is to give an overview of HPV infection sites in the human body beyond the genital tract. Moreover, the 'infective' nature of this virus needs elucidation as human papillomavirus (HPV) can establish latent residence in normal epithelia and in lymphocytes without clinical sign of disease⁵.

VIRUS BIOLOGY

The HPV genome consists of double-stranded circular DNA of about 8 kb comprising three regions. The non-coding region is called the Long Control Region (LCR), containing the viral origin of replication (ORI) and most of the transcription promoters. Two genes are in a region designated Late (L1 and L2), since they are the last genes to be expressed⁶. They encode structural proteins and facilitate the release of virions by the formation of a viral capsid⁷. Most viral genes are located in the early region (Early), which is expressed at the beginning of the viral cycle. Proteins E5, E6 and E7 are classified as oncogenic because they are involved in malignant transformation of HPV-infected cells⁸. E1 and E2 are known as regulatory proteins, while E4 protein is responsible for viral maturation and altering the intracellular matrix. In high-grade intraepithelial cancers, E1/E2 genes are depleted/interrupted⁹.

The information obtained about the life cycle of papillomaviruses comes from natural infections in animals, including rabbits, cattle and dogs¹⁰, since in vitro replication of papillomavirus are limited due to the difficulty in reproducing the stratification necessary for cellular viral maturation. Human infection with HPV is most focused in cervical cancer; the first site in the body in that HPV was found¹¹. The infection usually begins with the entry of the virus into cells of the basal layer of the epithelium (10 viral copies/cell). When they reach 50 copies/cell, the genes E1, E2, E6 and E7 begin to be expressed, leading to viral replication with low expression of these genes, in parallel with cell replication. The amplification of viral copy number greater than 1000 copies/cell is characterized by high expression of genes E6, E7, E1, E2, E5 and E4. Expression of L1 and L2

allows the production of capsid protein, resulting in the release of the virus by programmed cell death³.

In benign lesions caused by HPV, the virus can remain in the episomal form - free inside the cell - where after its life cycle and epithelial maturation, it is released through lysis of the cell. However, viral DNA can integrate into the genome of the host and initiate the carcinogenic process¹². During the integration of the viral genome into the human genome, there is partial loss (E2 and L2) or total (E4 and E5) of some viral proteins¹³. In this case, the absence of E2 protein expression can lead to an increased transcription of the E6 and E7 oncogenes of HPV types such as HPV16¹⁴.

CLINICAL ASPECTS

Characteristics lesions caused by the infection with HPV should be observed under visual inspection of characteristic clinical signs and presence of viral DNA through molecular tests. In the acute phase, the examination involves looking for the presence of condyloma acuminata (warts) and biopsy for histopathology. The presence of condyloma lesions in uterine cervix is determined by colposcopy or VIA (visual inspection with acetic acid), used to exacerbate pre-existing lesions and make it easier to detect the aceto-white epithelium suggestive of HPV infection¹⁵. In sub-clinical cases, colposcopy and microscopy of vaginal smears are used to search for cells with changes caused by the virus¹⁶. Procedures that examine the anus and rectum, as digital rectal examination, proctoscopy and anoscopy are considered effective in detecting these tumors¹⁷.

In the latent infection, without clinical sign, sensitive diagnostic techniques such as polymerase chain reaction (PCR) should be used. Other methods can be used for diagnosis, such as in situ molecular hybridization and hybrid capture¹⁸. A recent study showed that 78% of samples with dyskaryotic cervical cytology that initially tested negative for HPV could be considered positive after re-analysis using microarray tests, which show greater sensitivity than other methods¹⁹. HPV has been identified not only in gynecological carcinomas but also in tumors of other organs, especially of the oropharynx and upper aero-digestive tract.

Once the lesions are found, the objective of treatment involves the reduction, removal or its destruction. Recurrence of infections caused by HPV can result from latency of the virus, intrinsic failure of the therapeutic method used, new contamination or self-contamination¹⁸. The methods available for the clinical treatment of HPV are divided into application of topical agents, surgery and immunotherapy (**Table 1**). The choice of therapeutic treatment should be made according to patient characteristics, such as number, size and type of lesions (acuminate, flat or both) and

infection site. However, it is interesting that lesions with low-risk HPV types has no clinical application, thus, cannot be recommended treatment²⁰, suggesting the spontaneous resolution.

INFECTION SITES

At the end of the 1960s, cervical cancer was incorrectly associated with herpes virus type II²¹, and this link was adjusted in the following decade¹¹. At the start of the 1970s, the association between cervical cancer and HPV was confirmed. A German research virologist, Harold zur Hausen, conducted studies in this area for years which contributed to this important discovery, and in 2008, he was awarded the Nobel Prize. Currently, it is known that HPV can be found in several other sites of infection, not only in the genital region, which was originally the basis of the link²² (**Figure 1**). HPV is recognized as the causal factor of anogenital cancers (cervical, vaginal, vulvar, anal, and penile), and regions of head and neck cancers (oral cavity, pharynx, and larynx). However, for all other cancers describe here, the role of HPV is still under debate remaining unclear the relationship of this virus with some cancer sites.

Uterus

The World Health Organization (WHO) estimates that the number of global cancer deaths is expected to increase by 45% from 2007 to 2030 (from 7.9 million to 11.5 million deaths), and new cases of cancer in the same period are predicted to jump from 11.3 million in 2007 to 15.5 million in 2030. According to the Pan American Health Organization (PAHO), cervical cancer is projected to affect around 750,000 women by 2020 and 1 million new cases by 2050. Studies over the past 30 years show that the risk of HPV infection in the uterine cervix is very influenced by certain predisposing factors, which may influence vaccination²³. Sexual activity, number of sexual partners, age at onset of sexual activity and encounter with sexual partners, hormone replacement therapy²⁴, smoking, multiparity and other sexually transmitted diseases may increase the chances of viral infection²⁵. A genetic predisposition, frequency of re-infection, co-infection with more than one HPV type and altered hormone levels are also mentioned as facilitating factors for infection²⁶. Individual genetic characteristics, such as the polymorphism of major proteins of innate immunity, have also been linked to HPV infection, where mannose-binding lectin (MBL) shows a high association with the risk of HPV infection²⁷. A mutation in amino acid residue 72 (P72R) of p53 is also cited as a predisposing factor for HPV infection²⁸. An Italian study comparing women who never smoked with current smokers showed an increased risk of HPV infection of 44.2% compared with 23.5% in never smokers, and high possibility of multiple-type viral infections was observed²⁹. Predisposition to viral infection has been related to lifestyle and geographic disposition, making it important to analyze the incidence data of HPV type in particular populations.

Vagina

The incidence of invasive vaginal cancer is almost 1 per 100,000 women, where it is considered a rare disease³⁰. Acuminate vaginal lesions occur in less than 30% of women with vulvar condylomatosis¹⁸. HPV16, 18, 30, 58, 66, and 74 are associated with cancer of the vagina³¹, as well as other risk factors such as exposure to diethylstilbestrol in the uterus, immunosuppressive therapy, smoking²⁹, chronic irritation from the use of a vaginal pessary, radiotherapy for cervical cancer and genital herpes infections¹⁸. A vaginal infection is predominantly subclinical, and therefore under-diagnosed. It is characterized by an aceto-white epithelium and condylomatosis as white dots³². The symptoms are thick white discharge adhering to the vaginal wall, because of epithelial desquamation, and complaints of itching, burning and dyspareunia³³.

Vulva

Vulvar carcinoma is found in 3-5% of all gynecological malignancies, and 1% of all cancers in women, with an incidence rate of 1 to 2 per 100,000 patients³⁴. Squamous cell carcinomas (SCC) are the most common histological subtype, where they are observed in 90% of vulvar cancer cases. It is a non-estrogen-dependent lesion²⁴. HPV16 and 18 have been associated with non-keratinizing SCC in young women³⁵. HPV16 is the most frequent in vulvar cancer and in the region between the clitoris and urethra³⁶. Age of menarche, menopause, early sexual activity, number of partners, education, smoking, hysterectomy, and use of oral contraception or hormone therapy are well-known risk factors for vulvar carcinoma³⁷. Vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) can be classified as bowenoid and basaloid, according to the age of women affected. Bowenoid VIN affects young patients and is characterized by multiple lesions positive for HPV16, usually in bilateral areas with no hair¹⁸, with high capacity for natural regression. On the other hand, basaloid VIN is rare and typical of advanced age with location in areas with hair, unilaterally. The signs and symptoms in vulvar HPV infection may be varied and include the presence of warts (64%), itching (20.3%), discharge (4.6%), burning (2.7%), ulcer (2.3%), pain (1.4%), spots (1.4%), bleeding (1.0%), and dyspareunia (0.5%), which may be asymptomatic in 1.85% of cases¹⁸. The differential diagnosis of lesions associated with HPV in the genitalia can be complex due to the number of physiological and pathological conditions that may be similar to condyloma acuminatum, such as Buschke-Löwenstein tumor (giant condyloma), verrucous carcinoma, fibroepithelial polyps and vestibular papillomatosis³⁸.

Ovary

Ovarian cancer is the second most common gynecological malignancy in developed countries³⁹. Epithelial ovarian cancer (EOC) accounts for more than 90% of ovarian malignancies and is classified into four main histological subtypes - serous, endometrioid, clear-cell and mucinous carcinomas⁴⁰. HPV was detected in approximately 90% of endocervical adenocarcinomas⁴¹ and squamous intraepithelial lesions⁴². HPV was also identified in ovarian neoplasms, as showed for ovarian and endometrial cancer tissues examined for the presence of HPV showed amplification result for E6 gene. The amplified DNA sequences were then detected with Southern blot hybridization analysis. HPV was detected in both benign (50% ovarian, 70% endometrial) and malignant ovarian (27.2%) and endometrial (37.5%) tissue samples⁴³. The identification of viral DNA in ovarian and endocervical tumors may suggest the interpretation of metastasis related to areas of the genito-urinary tract. However, some authors found no relation between ovary malignance and the presence of HPV, showing the controversial condition of the infection.

Stomach

Because of the epitheliotropic nature of HPV, a link between intra-oral squamous cell carcinoma (OSCC) and this virus has been the focus of some research^{44, 45}. Food has been a new target of study as a co-factor for cancer caused by HPV. *Pteridium aquilinum*, a plant commonly known as bracken, can cause chromosomal abnormalities and hematuria in cattle, and in humans, it acts as an immunosuppressive agent, reducing the capacity of the immune system's resistance to the virus⁴⁶. In humans, it is known that quercetin (5,7,3',4'-tetrahydroxy-flavone), a flavonoid present in *P. aquilinum*, stops keratinocytes in G1 phase of the cell cycle, increasing the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Kip1, which is involved the expression of oncoproteins E6 and E7 in HPV16-transformed cells, leading to the failure of the cell cycle⁴⁷. Both men and animals have the virus in its latent form when eat the bracken, and they release their toxins allowing the virus to develop. This occurs due to the preference of the toxins by lymphocytes, causing chromosomal change and intense proliferation of growth factors and progression tumor⁴⁸. Through cytogenetic analysis of peripheral blood of animals with intoxication due this plant, Santos et al. (1998) reported that there is a possible association between cancers caused papillomavirus (PV) and the toxins originated from *Pteridium*⁴⁹.

Anus, Colon and Rectum

The association of HPV infections and epithelial abnormalities in the anus and rectum has been investigated since the 1980s^{50, 51}. Dysplasias and malignancies of the colon and rectum may also be related to HPV infections, up to 74%⁵². In women, the direct relationship between cervical and anal

infections is not clear. However, there is a higher prevalence of HPV in the anal canal of women with cervical intraepithelial neoplasias grade III⁵³. Moreover, there is a strong correlation between anal HPV infection and HIV-positive patients of both sexes, with anal infection being associated with multiple HPV genotypes^{54,55}. Family history of cancer of the colon and rectum, genetic predisposition to the development of chronic diseases of the intestine, diet high in animal fat, low consumption of fiber, and excessive alcohol consumption and smoking are described as the main risk factors associated with this neoplasm⁵⁶. Anal cancer has a great potential for cure if detected at an early stage, but its symptoms are similar to those of adenocarcinoma of the rectum (rectal bleeding, abdominal pain, change in bowel habits and weight loss⁵⁷).

Bladder

A variety of infectious conditions, including urinary tract infection, gonorrhea, syphilis, other bacteria and viruses such as HPV, HIV, HSV, and BK have been studied as potential risk factors for bladder carcinoma⁵⁸. However, there are discrepancies in the literature about the involvement of HPV in the etiology of cancer of the bladder^{59, 60}. HPV may have a great role in the progression of specific bladder malignancies, such as transitional cell carcinoma, promoting higher stages and/or grades through the inactivation of tumor suppressors or other unknown mechanisms⁶¹.

Penis and prostate

Penile carcinoma is a rare and potentially mutilating disease with a varied etiology, and HPV is considered a possible etiologic agent for cancer development. According to the method used for identification and geographic location, the prevalence of HPV DNA in carcinoma of the penis varies between 20 and 80%^{62, 63}. One study showed that about half of the penile tumors were associated with HPV 16/18 with little presence of other genotypes⁶⁴. According to its location on the penis, HPV can be found in the internal prepuce (60-90% of cases), body (8-55% of cases), the glans (1-20% of cases) and the scrotum (5-20%). Viral DNA has never been found in pseudoepitheliomatous keratotic and micaceous balanitis (PKMB), but a recent study suggested that HPV infection could allow the transformation of verrucous carcinoma in PKMB⁶⁵. The importance of HPV detection is related to the fact that men could act as a viral reservoir, transmitting the virus to their sexual partners, since it has been identified in the prostate and semen⁶⁶. Additionally, normal tissue and prostate cancer tissue are susceptible to infection by HPV, which could be considered a risk factor for the progression of cancer⁶⁷. HPV16⁶⁸ and 18⁶⁹ have been detected in patients with prostate cancer. The actual rates of HPV in prostatic adenocarcinoma oscillate between 0 and 75%, and many authors believe that the prostate is an important reservoir for HPV in men⁷⁰.

Head and neck

The term "head and neck cancer" includes lesions that affect regions such as the mouth and oral cavity, nose and paranasal sinuses, pharynx and larynx⁷¹. Thus, there are a variety of malignant and benign lesions of the head and neck that are related to HPV⁷². The mechanism of viral transmission of this type of cancer is poorly understood. It is believed that the epithelium of the deep tonsillar crypts, which is in straight contact with the lymphoid tissue, could be more vulnerable to HPV infection or transformation. Haddad et al.⁷³ proposed viral transmission among married couples as PCR diagnosis revealed identical viral genomes between them. Humoral response such as immunoglobulin production was also related to the viral infection⁷⁴. In this study the authors propose that women with low levels of total secretory IgA is more susceptible to HPV infection of the oral mucosa. Respiratory papillomatosis was described in children with benign lesion with high probability of recurrence, which can be effectively treated with locally administered of cidofovir⁷⁵. Squamous cell carcinoma of the oral mucosa is highly associated with high risk HPV⁷⁶, especially HPV26⁷⁷. However, in HIV-positive patients, healthy mucosae may show the presence oncogenic types of HPV⁷⁸. The patient's age, HPV type and numbers of surgeries are prognostic factors in the course of the disease, as well as the density of CD83+ dendritic cells in cancerous laryngeal tissue⁷⁹. In the pharynx, the lesions caused by HPV, have been described as benign. However, squamous cell carcinoma of the oropharynx was recently described as positive for HPV16 and 33, some with long-term survival after chemo- radiation treatment^{80,81}.

Ear

Chronic ear infections can be attributed to bacteria, but also have been associated with the presence of HPV. Patients with cholesteatoma of the middle ear have been shown viral DNA in the ear⁸². Findings demonstrated that HPV6 and 11 were reported to be present in those types of the ear lesions⁸³. This association could be related to the fact that HPV could find the possibility of replication in cholesteatoma of middle ear, since retraction pockets of epithelium and junction lines between squamous epithelium and mucosa occur⁸⁴.

Lung

Cancer of the lung is the most common type of cancer in the world. Risk factors related to this type of cancer is exposure to asbestos, the radioactive gas radon, environmental pollution, and recurrent pulmonary infections related to excess and deficiency of vitamin A. HPV6 and HPV11 are largely related to the occurrence of recurrent respiratory papillomatosis - lesions that occur mainly in the larynx – with geographic variation in incidence rates worldwide^{85, 86}. The incidence of HPV in lung

cancer in reviewed article varies from 0% (France-Toulouse/Cannes, Germany-Berlin + Heidelberg, Greece-Athens, USA-Texas, Japan-Kagawa) up to 79% (Greece-Athens 69%, Taiwan-Taichung 78.5%, Japan-Okinawa 79%), mainly in frozen and fixed-formalin paraffin embedded samples. In Europe and USA, the average reported incidences around 17% and 15%, respectively; while Asian lung cancer samples showed 35.7% of HPV infection rate⁸⁷.

Eyes

Infection with epidermodysplasia verruciformis-type human papilloma virus (EV-HPV) was described as capable of causing ocular cancer, with 86% of malignancies in biopsy samples of conjunctival cancer⁸⁸. Despite the retinoblastoma are predominantly of hereditary cause, the viral DNA was found in 82.3% paraffin-embedded samples of retinoblastoma tissue from Mexican patients with high prevalence of HPV06 (95.2%)⁸⁹. Indian patients with retinoblastoma showed 47% prevalence of HPV16 in 57% of samples with high degradation level of pRB⁹⁰. These observations suggest a role of HPV in the progression of this disease and lead some authors to believe that HPV can act as a co-factor in the progression of retinoblastomas⁹¹. A recent study described HPV05 and HPV08 prevalence in squamous cell carcinoma of conjunctiva from HIV-positive patients⁹².

Breast

The etiology of breast cancer is not yet clarified, but it is known that some factors are associated with its pathogenesis, such as family history, hormones, smoking, alcohol consumption, and some viruses⁹³. The possibility of involvement of HPV in breast cancer was described by Di Lonardo and collaborators⁹⁴, who detected HPV16 in 29.4% of women with breast cancer. Considering that breast region has a different response to steroid hormones, HPV infection can be greatly affected, since steroids can interact with viral LCR increasing transcription and transformation in infected cells⁹⁵. Paraffin embedded breast carcinoma specimens screened for HPV16 and 18 showed a 24.75% incidence in breast carcinomas, suggesting that their presence in the breast could be related to development of the malignant phenotype⁹⁶. The prevalence of alpha mucosal HPV was verified in 8% of colostrum and milk samples. Beta HPV types were highly prevalent in the epidermis of the nipple⁹⁷. However, the findings do not support the notion that HPV plays an important role in breast cancer⁹⁸.

Skin

About 10% of the global population has some form of wart at some moment in their life, which explains its frequent finding in both pediatric clinics and adult lesions¹⁸. Normally, occurs

regression, but warts may progress into malignant skin cancer during immunosuppression, where the new type of HPV 117 had been found in cutaneous warts⁹⁹. The transmission of HPV seen in clinical dermatology can occur via sexual activity (anogenital warts and orally), skin contact (contaminated objects and surfaces) or perianal contact (uterus). The association of HPV with exposure to ultraviolet light¹⁰⁰ has been suggested to be of relevance for the development of non-melanoma for up-regulated the transcription from HPV-8, 93 and 96¹⁰¹ and a risk factor for the formation of epidermodysplasia verruciforme (EV), where HPV5 and 8 were more associated¹⁰².

Blood

Circulating HPV DNA has been detected in advanced stages of cervical cancer, where studies have shown that the prevalence of HPV16 in plasma could be an important prognostic marker of advancing cervical disease¹⁰³. HPV16 was also found in lymph nodes of patients with early stage cervical carcinoma, where it was localized in mononuclear cells of 92.3% of patients with cervical infections¹⁰⁴. These data suggest that these cells could carry the virus through the blood. Hypothetically, HPV in plasma could be the result of bloodborne virus particles or necrosis of cells resulting in release of viral DNA into the circulation¹⁰⁵. Viral detection in the blood of patients with cervical carcinoma with HPV was 11.8% whereas papillomavirus DNA in the lymph node was detected and correlated with metastasis¹⁰⁶. Since HPV is an epitheliotropic virus, its presence in the bloodstream, associated with peripheral blood mononuclear cells can be interpreted as a type of metastasis^{107, 108}.

Others sites

The hands can act as a medium in many diseases, where fingers and nails are pointed out as an alternative mode of viral transmission, in addition to the contact with the mucous membranes. In 27% of patients, an association was found between HPV type detected in hands and genital lesion of the same patient¹⁰⁹. Periungual squamous cell carcinoma (SCC) is frequently associated with alpha-HPV infections, suggesting that capacity plays an important role in tumorigenesis, noting that beta-HPVs are rare¹¹⁰. The wart lesions caused by HPV can also lead to nail dystrophy when infection occurs in the matrix. Genotyping has shown the presence of HPV16, 34, 35 and 57 with SCC of the nail¹¹¹. HPV15 was also associated with an X-linked dominant disorder (incontinentia pigmenti) with subungual tumors¹¹².

The presence of HPV in hairs plucked from the pubic and perianal regions of patients with genital warts was investigated, since they are of clinical importance in the development of anogenital warts. HPV6 and 11 was found in 24% of hair samples from the pubic area and 36% from the perianal region¹¹³. Viral presence and distribution in the plucked eyebrow hairs showed different HPV

genotypes: SIBX4, SIBX5 and SIBX6¹¹⁴. These results suggest that hair follicles can act as an endogenous reservoir for HPV, which may play a role in recurrences of genital warts.

FINDINGS OF HPV WITHOUT CYTOLOGY ALTERATION

Shukla et al. (2009) showed in their study the prevalence of HPV infection in cancers of different organ sites in Indian population¹¹⁵. Despite the large number of different types of cancer in which HPV was found, these numbers are low in people infected by this virus. In women infected by HPV, 90% of the infections resolve spontaneously, only 10% can become persistent which 3-4% can progress to intraepithelial lesions¹¹⁶. The incidence of high-grade lesion will achieve 0.7 to 1% and 0.1% may progress to invasive cancer if not detected and treated early¹¹⁶. Patients initially diagnosed as positive for HPV and subsequently described with undetectable levels of HPV showed higher rates of CIN regression (63%) than patients with HPV persistence (41%)¹¹⁷.

Some controversial findings of viral DNA in putative uninfected samples for HPV or in control groups^{118,119} leads to a reflection about the viral history. HPV colonization has been suggested as protective to the host and this virus could exist as commensal without causing any detectable existence or can be lead to a verrucous structure⁵. Similar association of protective effect has been shown for Epstein–Barr virus, human cytomegalovirus and herpes virus, being able to confer resistance to infection by bacterial pathogens¹²⁰. HPV was also indicated to be an opportunistic virus¹²¹ once the pathogenicity is activated for co-infections with the HIV¹²².

Moreover, there is a tendency to abolish the HPV type classification in high and low risk, whereas HPV6 has been isolated in cancer penile under single and multiple infections¹²³. Therefore, it seem that in the future HPV risk type will be related to the characteristics of the host through biochemical and immune imbalance associated with risk factors for HPV acquiring that are responsible for the progression of precursor lesions to cancer.

FINAL REMARKS

Infection of the cervix is the most studied clinical occurrence involving HPV, but this virus can be found in several sites in the human body. Only now, with more powerful technologies such as high sensitive HPV chips, the detection of HPV at different body sites have been described, usually involving virus types other than cervical ones. Reviews and papers in this area make us wonder whether HPV can occur in at a certain site in humans without causing disease appoint the possibility that HPV acts as an opportunist microorganism. This fact can explain the findings of this virus in the body without resulting in clinical signals and in predisposing moments like immune depletion developed the pathogenicity. Further studies should clarify whether the presence of the virus in

different organs can be considered a rare clinical finding or simply something that has been overlooked, and therefore under-diagnosed.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to Dr. Albert Leyva for grammatical corrections of this review.

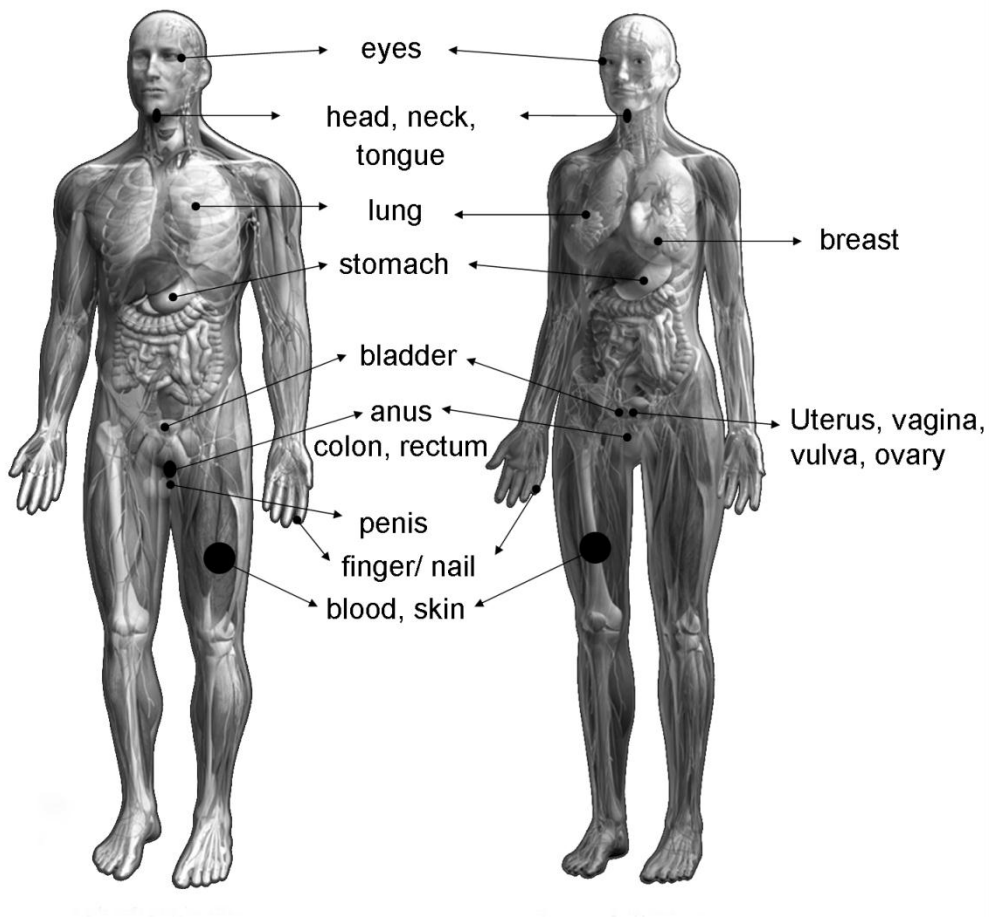


Figure 1. Schematic representation of possible infection sites of human papillomavirus. Modified from Zygot Media Group, Inc.

Table 1. List of treatment according to the clinical lesion caused by Human papillomavirus.

9, 15

	TREATMENT	APPLICATION
Topical agents	Trichloroacetic acid (80-90%)	Lesions vulvar and penile.
	5-Fluorouracil (5%)	Lesions on the penis, male urethra, vulva and vagina.
	Interleukin-2	Refractory lesions caused by HPV.
	Podophyllin (25%)	Skin lesions
	Interferon	After surgical removal of visible lesions, as adjuvant treatment.
	Imiquimod (5%)	Vegetative lesions.
Surgical treatments	Curettage	Verruciform lesions.
	Conization and excision to high frequency	Intraepithelial neoplasia located in the area of transformation.
	Excision with scissors	Verruciform lesions, especially exophylic and pedunculated.
	Excision with scalpel	Intraepithelial neoplasia of the skin and mucosa.
	CO ₂ laser	Lesions on the vulva, vagina, uterine cervix and urethral.
Homeopathy	<i>Thuja occidentalis</i>	Vegetative lesions such as warts, papillomas, condylomas and excrescences of various types.
	Acupuncture	Adjuvant treatment of papillomatosis lesions.
Immunotherapy	Retinoid	Viral lesions of the skin and mucosa and help in the surgical treatment after invasive cancers, precancerous skin lesions, cervix and vulva.
	Isoprinosine	Relapse after treatment with physical agents in condylomatous lesions, lesions associated with intraepithelial neoplasia, and lesions that are refractory, recurrent and extensive.

REFERENCES

1. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of

- papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; **401**(1): 70-9.
2. de Villiers EM, de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; **324**: 17-27.
 3. Stanley M.A. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2001; **15**(5): 663-76.
 4. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* 2005; **15**(5): 727-46.
 5. Burkhart CG, Burkhart CN. If Papillomavirus Found Universally in Epidermal Tissues, what does that Mean if a PCR Pap Test is Positive? *The Open Dermatology Journal* 2009; **3**:52-53
 6. Terhune SS, Hubert WG, Thomas JT, Laimins LA. Early polyadenylation signals of human papillomavirus type 31 negatively regulate capsid gene expression. *J Virol* 2001; **75**(17): 8147-57.
 7. Favre M, Ramoz N, Orth G. Human papillomaviruses: general features. *Clin Dermatol* 1997; **15**(2): 181-98.
 8. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**(9): 690-8.
 9. Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *Journal of Virological Methods* 2009; **158**: 180-183.
 10. Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. *Rev Med Virol* 2006; **16**(3): 139-49.
 11. zur Hausen H. Oncogenic herpes viruses. *Biochim. Biophys. Acta* 1974; **417**: 25–53.
 12. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002; **40**(3): 886-91.
 13. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**(5): 342-50.
 14. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 1995; **69**(5): 2989-97.
 15. Antunes AA, Lyra R, Calado AA, Antunes MA, Falcão E. Prevalência de coilocitose em biópsias penianas de parceiros de mulheres com lesões genitais induzidas pelo HPV. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, 2004. **26**(7).
 16. Gompel C, Koss L. *Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas*. 1ª ed. São Paulo: Manole, 1997.
 17. Mistrangelo M, Cassoni P, Scozzari G, Castellano I, Gavello G, Corno F, Morino M. Perianal granular cell tumor: report of a case and review of the literature. *Tumori*. 2009; **95**(4):538-41.
 18. Carvalho JJM, Oyakawa N. *Papilomavírus humano, I Consenso Brasileiro de HPV*, 1999.
 19. Peevor RB, Jones S, Fiander J, Hibbitts AS. Human Papillomavirus negative but dyskaryotic cervical cytology: Re-analysis of molecular testing. *Journal of Clinical Virology* 2009; **44**(4): 322-324.
 20. Monk BJ, Wiley DJ. Human papillomavirus infections - Truth or consequences. *Cancer* 2004; **100**(2): 225–227.

21. Rawls WE, Tompkins WA, Figueroa ME, Melnick JL. Herpesvirus type 2: association with carcinoma of the cervix. *Science* 1968; **161**: 1255–1256.
22. zur Hausen H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977; **78**: 1–30.
23. Dempsey AF, Gebremariam A, Koutsky LA, Manhart L. Using risk factors to predict human papillomavirus infection: implications for targeted vaccination strategies in young adult women. *Vaccine* 2008; **26**(8): 1111-7.
24. Singh P, Oehler MK. Hormone replacement after gynaecological cancer. *Maturitas* 2010; **65**(3): 190-7.
25. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 2001; **164**(7): 1017-25.
26. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; **16**(1): 1-17.
27. Guimaraes V, Guimaraes R, Brandao L, Baldez da Silva MF, Milanese M, Segat L, et al. Association between MBL2 gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Hum Immunol* 2008; **69**(4-5): 273-8.
28. Giannoudis A, Graham DA, Southern SA, Herrington CS. p53 codon 72 ARG/PRO polymorphism is not related to HPV type or lesion grade in low- and high-grade squamous intra-epithelial lesions and invasive squamous carcinoma of the cervix. *International Journal of Cancer* 1999; **83**(1): 66-69.
29. Ripabelli G, Grasso GM, Del Riccio I, Tamburro M, Sammarco ML. Prevalence and genotype identification of human papillomavirus in women undergoing voluntary cervical cancer screening in Molise, Central Italy. *Cancer Epidemiol* 2010; **34**(2): 162-7.
30. Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM, Shera KA, Carter JJ, McKnight B, et al. A Population-Based Study of Squamous Cell Vaginal Cancer: HPV and Cofactors. *Gynecologic Oncology* 2002; **84**(2): 263-270.
31. Ikenberg H, Runge M, Göppinger A, Pfleiderer A. Human papillomavirus DNA in invasive carcinoma of the vagina. *Obstet Gynecol*, 1990; **76**(3): 432-8.
32. Zaino R, Robboy S, Bentley R, Kurman R. Diseases of the Vagina. In Kurman RJ, Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract 4th edition, 1994: 131-184.
33. Sugase M, Matsukura T. Distinct manifestations of human papillomaviruses in the vagina. *Int J Cancer* 1997; **72**(3): 412-5.
34. Hacker N. Vulvar cancer. In Berek J, Hacker N, Practical gynecologic oncology 3rd edition, 2000: 553–96.
35. van der Avoort IA, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte JM, de Hullu JA, de Wilde PC, et al. Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *Int J Gynecol Pathol* 2006; **25**(1): 22-9.
36. Hampl M, Deckers-Figiel S, Hampl JA, Rein D, Bender HG. New aspects of vulvar cancer: changes in localization and age of onset. *Gynecol Oncol* 2008; **109**(3): 340-5.
37. Ahr A, Rody A, Kissler S, Kaufmann M, Gätje R. Risk factors for recurrence of vulvar intraepithelial neoplasia III (VIN III). *Zentralbl Gynakol* 2006; **128**(6): 347-51.
38. Kataoka MY, Sala E, Baldwin P, Reinhold C, Farhadi A, Hudolin T, et al. The accuracy of magnetic

- resonance imaging in staging of vulvar cancer: A retrospective multi-centre study. *Gynecol Oncol* 2010; **117**(1): 82-7.
39. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer Statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; **56**:106-130.
40. Chauhan SC, Singh AP, Ruiz F, Johansson SL, Jain M, Smith LM, et al. Aberrant expression of MUC4 in ovarian carcinoma: diagnostic significance alone and in combination with MUC1 and MUC16 (CA125). *Modern Pathology* 2006; **19**: 1386–1394.
41. Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvård C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer* 2001; **37**(2): 246-50.
42. Said HM, Ahmed K, Burnett R, Allan BR, Williamson AL, Hoosen AA. HPV genotypes in women with squamous intraepithelial lesions and normal cervixes participating in a community-based microbicide study in Pretoria, South Africa. *J Clin Virol.* 2009; **44**(4): 318-21.
43. Lai CH, Hsueh S, Lin CY, Huang MY, You GB, Chang HC, Pao CC. Human papillomavirus in benign and malignant ovarian and endometrial tissues. *Int J Gynecol Pathol* 1992; **11**: 210–215.
44. Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; **15**:188–96.
45. Boy S, Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, van Heerden M, van Heerden W. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas – commensal, aetiological agent or contamination? *J Oral Pathol Med* 2006; **35**: 86–90.
46. Recouso RC, Stocco dos Santos RC, Freitas R, Santos RC, de Freitas AC, Brunner O. Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. *Veterinary and Comparative Oncology* 2003; **1**: 22-29.
47. Beniston, RG, Campo MS. Quercetin elevates p27 (Kip1) and arrests both primary and HPV16 E6/E7 transformed human keratinocytes in G1. *Oncogene* 2003; **22**(35): 5504-14.
48. Ulian, CMV, Baptista AAS, Ventura RFA, Sakate M. *Pteridium aquilinum* na alimentação humana: uma revisão. *Acta Veterinaria Brasilica* 2010; **4**(2): 64-69.
49. Santos, RCS; Lindsey, CJ.; Ferraz, OP; Pinto, JR; Mirandola, RS; Benesi, FJ; Birgel, EH; Pereira, CAB; Beçak, W. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: on experimental model. *J. Gen. Virol* 1998; **79**(9): 2127- 2135.
50. Lafreniere R, Ketcham AS. Primary squamous carcinoma of the rectum - Report of a case and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 1985; **28**: 967-972.
51. Frazer IH, Crapper RM, Medley G, Brown T, Mackay IR. Association between anorectal dysplasia, human papillomavirus, and human immunodeficiency virus infection in homosexual men. *Lancet* 1986; **328**(8508): 657-60.
52. Pérez LO, Abba MC, Laguen RM, Golijow CD. Analysis of adenocarcinoma of the colon and rectum: detection of human papillomavirus (HPV) DNA by polymerase chain reaction. *Colorectal Dis* 2005; **7**(5): 492-5.

53. Véó CAR, Saad SS, Nicolau SM, Melani AGF, Denadai M VA. Study on the prevalence of human papillomavirus in the anal canal of women with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; **140**(1):103-7.
54. Salit IE, Tinmouth J, Chong S, Raboud J, Diong C, Su D, et al. Screening for HIV-Associated Anal Cancer: Correlation of HPV Genotypes, p16, and E6 Transcripts with Anal Pathology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; **18**(7):1986-92.
55. Palefsky JM. Human papillomavirus infection and anogenital neoplasia in human immunodeficiency virus-positive men and women. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1998; **23**: 15-20.
56. Haas P, Anton A, de Francisco A. Colorectal cancer in Brazil: whole grains consumption as prevention. *RBAC* 2007; **39**(3): 231-235.
57. Audeau A, Han HW, Johnston MJ, Whitehead MW, Frizelle FA. Does human papilloma virus have a role in squamous cell carcinoma of the colon and upper rectum? *Eur J Surg Oncol* 2002; **28**: 657-660.
58. Williamson SR, Montironi R, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Davidson DD, Cheng L. Diagnosis, evaluation and treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder: The state of the art. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010; **76**(2): 112-126.
59. Lopez-Beltran A, Escudero AL, Vicioso L, Munoz E, Carlos Carrasco J. Human papillomavirus DNA as a factor determining the survival of bladder cancer patients. *Br J Cancer* 1996; **73**(1): 124-127.
60. Mvula M, Iwasaka T, Iguchi A, Nakamura S, Masaki Z, Sugimori H. Do human papillomaviruses have a role in the pathogenesis of bladder carcinoma? *The Journal of urology* 1996; **155**(2): 471-474.
61. Barghi MR, Hajimohammadmehdiarbab A, Hosseini Moghaddam SMM, Kazemi B. Correlation between human papillomavirus infection and bladder transitional cell carcinoma. *BMC Infectious Diseases* 2005; **5**: 102.
62. Gross G, Pfister H. Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts. *Med Microbiol Immunol* 2004; **193**(1): 35-44.
63. Senba M, Kumatori A, Fujita S, Jutavijittum P, Yousukh A, Moriuchi T, et al. The prevalence of human papillomavirus genotypes in penile cancers from northern Thailand. *J Med Virol* 2006; **78**(10): 1341-6.
64. Miralles-Guri C, Bruni L, Cubilla AL, Castellsagué X, Bosch FX, de Sanjosé S. HPV prevalence and type distribution in penile carcinoma. *J Clin Pathol* 2009; **62**(10): 870-8.
65. Kang BS, Lee SD, Park YM, Cho SY, Kang H. Is Recurrent Pseudoepitheliomatous Keratotic Balanitis Related to Human Papillomavirus Infection? *Acta Derm Venereol* 2010; **90**(2): 208-9.
66. Chang AR. Genital human papillomavirus infection in Hong Kong. *HKMJ* 1996; **2**: 80-88.
67. Hisada M, Rabkin CS, Strickler HD, Wright WE, Christianson RE, van den Berg BJ. Human papillomavirus antibody and risk of prostate cancer. *JAMA* 2000; **283**(3): 340-341.
68. Serth J, Panitz F, Paeslack U, Kuczyk MA, Jonas U. Increased levels of human papillomavirus type 16 DNA in a subset of prostate cancers. *Cancer Res* 2009; **59**: 823-825.
69. Weijerman PC, van Drunen E, Konig JJ, Teubel W, Romijn JC, Schroder FH, et al. Specific cytogenetic aberrations in two novel human prostatic cell lines immortalized by human papillomavirus type 18 DNA. *Cancer Genet. Cytogenet* 1997; **99**: 108-115.

70. Machado MT, Kappáz GT, Debert I, Goldenstein PT, Aldrighi, APS, Simardi, LH, et al. HPV e câncer de próstata: Análise crítica do envolvimento na carcinogênese da célula prostática/ HPV and prostate cancer. *Arq méd ABC* 2001; **25**(2): 18-23.
71. Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; **32**(1): S59-66.
72. Chuang AY, Chuang TC, Chang S, Zhou S, Begum S, Westra WH, et al. Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2008; **44**(10): 915-9.
73. Haddad R, Crum C, Chen Z, Krane J, Posner M, Li Y, et al. HPV16 transmission between a couple with HPV-related head and neck cancer. *Oral Oncol* 2008; **44**(8): 812-5.
74. Gonçalves AK, Giraldo P, Barros-Mazon S, Gondo ML, Amaral RL, Jacyntho C. Secretory immunoglobulin A in saliva of women with oral and genital HPV infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; **124**(2): 227-231.
75. Bielecki I, Mniszeka J, Cofala M. Intralesional injection of cidofovir for recurrent respiratory papillomatosis in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; **73**(5): 681-684.
76. Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, García-Cuellar CM, Guido-Jiménez M, Méndez-Martínez R, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Arch Med Res* 2008; **39**(2): 189-97.
77. Muenscher A, Feucht HH, Kutta H, Tesche S, Wenzel S. Integration of human papilloma virus type 26 in laryngeal cancer of a child. *Auris Nasus Larynx* 2009; **36**(2): 232-234.
78. Richter KL, Van Rensburg EJ, Van Heerden WFP, Boy SC. Human papilloma virus types in the oral and cervical mucosa of HIV-positive South African women prior to antiretroviral therapy. *J Oral Pathol Med* 2008; **37**(9): 555-9.
79. Kovalenko S, Lukashenko P, Romanovskaya A, Soldatski IL, Bakanov SI, Pfister H, et al. Distribution and density of CD1a+ and CD83+ dendritic cells in HPV-associated laryngeal papillomas. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; **73**(2): 249-256.
80. Glombitza F, Guntinas-Lichius O, Petersen I. HPV status in head and neck tumors. *Pathol Res Pract* 2010; **206**(4): 229-34.
81. Nichols AC, Faquin WC, Westra WH, Mroz EA, Begum S, Clark JR, et al. HPV-16 infection predicts treatment outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 2009; **140**(2): 228-234.
82. Bai Y, Yan L, Li S, Bai Q. Expression of human papillomavirus DNA in cholesteatoma of the middle ear. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2000; **35**(5): 352-5.
83. Chao WY, Chang SJ, Jin YT. Detection of human papillomavirus in cholesteatomas. *Eur Arch of Otorhinolaryngol* 2000; **257**(3): 120-123.
84. Stremlau A, Helms J, Müller-Hermelink HK, Hoppe F, de Villiers EM. Detection of DNA of human papillomaviruses (HPV) in an "aggressively" growing cholesteatoma. Is cholesteatoma a virus-induced tumor? *HNO* 1995; **43**(1): 3-5.

85. Donne AJ, Hampson L, Homer JJ, Hampson IN. The role of HPV type in Recurrent Respiratory Papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; **74**: 7-14.
86. Gelinas JF, Manoukian J, Cote A. Lung involvement in juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review of the literature. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008; **72**(4): 433-52.
87. Klein F, Amin Kotb WF, Petersen I. Incidence of human papilloma virus in lung cancer. *Lung Cancer* 2009; **65**:13-8.
88. Sharquie KE, Al-Meshhadani SA, Al-Nuaimy AA. Invasive squamous cell carcinoma of the eyes in patients with epidermodysplasia verruciformes. *Saudi Med J* 2007; **28**(5): 787-790.
89. Montoya-Fuentes H, de la Paz Ramirez-Munoz M, Villar-Calvo V, Suarez-Rincon AE, Ornelas-Aguirre JM, Vazquez-Camacho G, et al. Identification of DNA sequences and viral proteins of 6 human papillomavirus types in retinoblastoma tissue. *Anticancer Res* 2003; **23**(3C): 2853-62.
90. Mohan A, Venkatesan N, Kandalam M, Pasricha G, Acharya P, Khetan V, et al. Detection of Human Papillomavirus DNA in Retinoblastoma Samples: A Preliminary Study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009; **31**(1): 8-13.
91. Espinoza JP, Cardenas VJ, Luna CA, Fuentes HM, Camacho GV, Carrera FM, et al. Loss of 10p material in a child with human papillomavirus-positive disseminated bilateral retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; **161**(2): 146-50.
92. Ateenyi-Agaba C, Franceschi S, Wabwire-Mangen F, Arslan A, Othieno E, Binta-Kahwa J, et al. Human papillomavirus infection and squamous cell carcinoma of the conjunctiva. *British Journal of Cancer* 2010; **102**(2): 262-267.
93. Liu Y, Klimberg S, Andrews NR, Hicks CR, Peng H, Internati MC, et al. Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers. *J Hum Virol* 2001; **4**: 329-334.
94. Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 1992; **21**(2): 95-100.
95. Wu MH, Chan JY, Liu PY, Liu ST, Huang SM. Human papillomavirus E2 protein associates with nuclear receptors to stimulate nuclear receptor- and E2-dependent transcriptional activations in human cervical carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**(2): 413-25.
96. Damin AP, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; **84**(2): 131-7.
97. Cazzaniga M, Gheit T, Casadio C, Khan N, Macis D, Valenti F, et al. Analysis of the presence of cutaneous and mucosal papillomavirus types in ductal lavage fluid, milk and colostrum to evaluate its role in breast carcinogenesis. *BMC Proceedings* 2009; **3**(5): S5.
98. Mendizabal-Ruiz AP, Morales JA, Ramírez-Jirano LJ, Padilla-Rosas M, Morán-Moguel MC, Montoya-Fuentes H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2009; **114**(1): 189-194.
99. Köhler A, Gottschling M, Förster J, Röwert-Huber J, Stockfleth E. Genomic characterization of a novel human papillomavirus (HPV-117) with a high viral load in a persisting wart. *Virology* 2010; **399**(1): 129-133

100. Ramagosa R, de Villiers EM, Fitzpatrick JE, Dellavalle RP. Human papillomavirus infection and ultraviolet light exposure as epidermoid inclusion cyst risk factors in a patient with epidermodysplasia verruciformis? *Journal of the American Academy of Dermatology* 2008; **58**(5): S68.e1-S68.e6
101. Vasiljević N, Nielsen L, Doherty G, Dillner J, Forslund O, Norrild B. Differences in transcriptional activity of cutaneous human papillomaviruses. *Virus Res.* 2008; **137**(2): 213-9.
102. Deau MC, Favre M, Orth G. Genetic heterogeneity among human papillomaviruses (HPV) associated with epidermodysplasia verruciformis: evidence for multiple allelic forms of HPV5 and HPV8 E6 genes. *Virology* 1991; **184**(2): 492-503.
103. Gnanamon M, Peedicayil A, Subhashini J, Ram TS, Rajasekar A, Gravitt P, et al. Detection and quantitation of HPV 16 and 18 in plasma of Indian women with cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2010; **116**(3): 447-451.
104. Chan PK, Yu MM, Cheung TH, To KF, Lo KW, Cheung JL, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in primary tumour and lymph nodes of patients with early stage cervical carcinoma. *J Clin Virol* 2005; **33**(3): 201-5.
105. Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV- associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 4171-5.
106. Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, Sridharan G, John S, Shaji RV, Chandy G. HPV DNA in plasma of patients with cervical carcinoma. *J Clin Virol* 2004; **31**(3): 204-9.
107. Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM. Could human papillomaviruses be spread through blood? *J Clin Microbiol* 2005; **43**(11): 5428-34.
108. Pao CC, Hor JJ, Yang FP, Lin CY, Tseng CJ. Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. *Journal of Clinical Oncology* 1997; **15**: 1008-1012.
109. Sonnex C, Strauss S, Gray JJ. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. *Sex Transm Infect* 1999; **75**(5): 317-9.
110. Kreuter A, Gambichler T, Pfister H, Wieland U. Diversity of human papillomavirus types in periungual squamous cell carcinoma. *British Journal of Dermatology* 2009; **161**:1262-1269.
111. McCown H, Thiers B, Cook J, Acker S. Global nail dystrophy associated with human papillomavirus type 57 infection. *Br J Dermatol* 1999; **141**(4): 731-5.
112. Donati P, Muscardin L, Amantea A, Paolini F, Venuti A. Detection of HPV-15 in painful subungual tumors of incontinentia pigmenti: successful topical therapy with retinoic acid. *Eur J Dermatol* 2009; **19**(3): 243-7.
113. Boxman ILA, Hogewoning A, Mulder LHC, Bavinck, JNB, ter Schegget, J. Detection of Human Papillomavirus Types 6 and 11 in Pubic and Perianal Hair from Patients with Genital Warts. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 2270-2273.

114. Kocjan BJ, Poljak M, Seme K, Potocnik M, Fujs K, Babic DZ. Distribution of human papillomavirus genotypes in plucked eyebrow hairs from Slovenian males with genital warts. *Infection, Genetics and Evolution* 2005; **5**(3): 255-259.
115. Shukla S, Bharti AC, Mahata S, Hussain S, Kumar R, Hedau S, et al. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. *Indian J Med Res* 2009; **130**(3): 222-233.
116. SPG, Sociedade Portuguesa de Ginecologia, Vacina contra o HPV – Reunião de Consenso Nacional. 2007; 6-7.
117. Chan JK, Monk BJ, Brewer C, Keefe KA, Osann K, McMeekin S, Rose GS, Youssef M, Wilczynski SP, Meyskens FL, Berman ML. HPV infection and number of lifetime sexual partners are strong predictors for 'natural' regression of CIN 2 and 3. *Br J Cancer* 2003; **89**(6):1062-6.
118. Kerkar SC, Latta S, Salvi V, Mania-Pramanik J. Human Papillomavirus infection in asymptomatic population. *Sex Reprod Healthc* 2011; **2**(1): 7-11.
119. Powell J, Strauss S, Gray J, Wojnarowska F. Genital carriage of human papilloma virus (HPV) DNA in prepubertal girls with and without vulval disease. *Pediatr Dermatol* 2003; **20**(3):191-4.
120. Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* 2007; **447**: 326-329.
121. Price P, Keane NM, Stone SF, Cheong KY, French MA. MHC haplotypes affect the expression of opportunistic infections in HIV patients. *Hum Immunol* 2001; **62**(2):157-64.
122. Lisco A, Vanpouille C, Margolis L. War and Peace between Microbes: HIV-1 Interactions with Coinfecting Viruses. *Cell Host & Microbe* 2009; **6**(5): 403-408.
123. Backes DM, Kurman RJ, Pimenta JM, Smith JS. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. *Cancer Causes Control*. 2009; **20**(4):449-57.

Anexo 3

Manuscript format (International Journal of Infectious Diseases)

General: The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed 'graphically designed' equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility.

When preparing tables, preferably use a table grid and use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts. Do not import the figures into the text file but instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text. Each figure must be submitted separately as requested at the file upload stage of submission. For further information on the preparation of electronic illustrations, please refer to the "Tables and Figures" section.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spellchecker' function of your wordprocessor.

The entire manuscript, including the abstract, acknowledgements, references, tables, figures, and legends, must be double spaced, with a margin of at least 2.5 cm. On assignment to an editor, each manuscript will be assigned a number, which will be provided to the author. The author should refer to this number in all ensuing correspondence. All manuscripts (including correspondence) will be subject to peer review. A rapid response to the authors will be more feasible if the manuscript is prepared as stipulated in the Instructions to Authors. Expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se* should not be in italics.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Numbers and measurements: Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Title Page: The title page must include each author's full name and academic affiliations. The author to whom correspondence concerning the manuscript and to whom requests for reprints should be directed must be designated, as well as the corresponding address, telephone, fax, and e-mail. Manuscripts that were presented as part of a meeting must include the title, location, and date of the meeting on the title page. *Abstract:* A structured abstract of 150 to 200 words must be provided as part of each manuscript, except correspondence. The abstract should consist of four paragraphs, labelled with the following headings: objectives, design or methods, results, conclusions, or alternative headings appropriate to the format of the paper. The abstract should not refer to footnotes or references.

Keywords: Immediately after the abstract, provide a maximum of six keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be used.

Acknowledgements: Place acknowledgements, including information on grants received, before the references, in a separate section, and not as a footnote on the title page.

References: Indicate references by superscript numbers in the text.

Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9.

Reference to a book:

2. Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979. Reference to a chapter in an edited book:

3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than six authors the first six should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-934) (see also <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>) References to personal communications and to unpublished material must be incorporated, in parentheses, at the appropriate place in the text. References to congress abstracts should be cited in the reference section if they have been published previously in an official book of abstracts from the congress; otherwise they should be incorporated in the text. The author is responsible for the accuracy and completeness of the references.

Citing and listing of web references: Such article citations should include the DOI (digital object identifier).

For example:

Boutayeb A, Twizell EH, Achouayb K, Chetouani A. A mathematical model for the burden of diabetes and its complications. *Biomed Eng Online* 2004;3:20. doi:10.1186/1475-925X-3-20. The DOI is a persistent identifier, which remains with the article even after it is published in print. See <http://www.doi.org> for details.

If the reference does not have a DOI, the full URL should be given. Any further information, if known (author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given.

Style: For stylistic questions, authors are referred to the *Chicago Manual of Style*, 14th Edition, 1993, published by the University of Chicago Press.

Abbreviations: Abbreviations in the text are discouraged. If a term appears repeatedly, however, an abbreviation may be introduced parenthetically at the initial mention of the term and used thereafter in place of the term. Abbreviations of conventional or SI units of measurement may be used without introduction.

References to drugs: The generic name of a drug should be used as a general rule; however, the full name or the commercial name of the drug, as well as the name and location of the supplier, may be given in addition if appropriate.

Tables and Figures: Data reported either in a table or in a figure should be illustrative of information reported in the text, but should not be redundant with the text. Each table must be presented at the end of the manuscript on a separate page and numbered in order of appearance in the text. The title of the table must appear after the number. Each table must include appropriate headings. Footnotes, when necessary, must be identified by letters. Units of measurement must be clearly indicated.

Figures should not be imported into the manuscript text file but submitted separately as requested at the file upload stage of submission. A short detailed legend should be provided for each figure. All legends must be collected together on a separate page following the body of the manuscript.

For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Photomicrographs should include a micron bar or other appropriate scale marking.

Bacterial nomenclature: Microbes should be referred to by their scientific names according to the binomial system used in the latest edition of *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (The Williams and Wilkins Co.). When first mentioned, the name should be in full and written in italics. Thereafter, the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. Aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning(s) unclear the names of organisms should be given in full. Only those names included in the Approved Lists of Bacterial Names (*Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420) and/or which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since January 1980 are acceptable. If there is a good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, it should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning its use made in the text (e.g. *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556).

Symbols for units of measurement must accord with the Système International (SI): However, blood pressure should be expressed in mmHg and haemoglobin as g/dl.

GenBank/DNA sequence linking: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For *each and every* accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See example below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the **electronic copy**, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Supplementary material submission. Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/copyright>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author by email, confirming receipt of the manuscript, together with a form facilitating the transfer of copyright. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written

permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases : contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: Tel. (+1) 215 238 7869 ; Fax (+1) 215 238 2239; e-mail healthpermissions@elsevier.com . Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

Ethical Consideration. Work on human beings that is submitted to *International Journal of Infectious Diseases* should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines.

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent which should be documented in your paper. Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, Elsevier must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to Elsevier on request. Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. If such consent has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Randomised Controlled Trials. All randomised controlled trials submitted for publication in *International Journal of Infectious Diseases* should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org/?0=1001> for more information. *International Journal of Infectious Diseases* has adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this purpose, a clinical trial is defined as any research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between a medical intervention and a health outcome. Studies designed for other purposes, such as to study pharmacokinetics or major toxicity (e.g. phase I trials) would be exempt. Further information can be found at www.icmje.org.

Conflicts of Interest. At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Authorship. All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgement. All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Role of the Funding Source. All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Proofs. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the responsibility of the author. A form with queries from the copyeditor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required.

Funding body agreements and policies
Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies> **Sponsored Articles**

International Journal of Infectious Diseases now offers authors the option to sponsor non-subscriber access to individual articles. The access sponsorship contribution fee per article is \$3,000. This contribution is necessary to offset publishing costs - from managing article submission and peer review, to typesetting, tagging and indexing of articles, hosting articles on dedicated servers, supporting sales and marketing costs to ensure global dissemination via ScienceDirect, and permanently preserving the published journal article. The sponsorship fee excludes taxes and other potential author fees such as color charges which are additional.

- Authors can specify that they would like to select this option after receiving notification that their article has been accepted for publication, but not before. This eliminates a potential conflict of interest by ensuring that the journal does not have a financial incentive to accept an article for publication.
- Authors who have had their article accepted and who wish to sponsor their article to make it available to non-subscribers should complete and submit the sponsored article order form.

Anexo 4

Comprovação de Submissão

Manuscript Number: IJID-D-10-00737

Article Title: HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION THROUGH THE HUMAN BODY

International Journal of Infectious Diseases

04 Nov 2010

Dear Dr Martins,

Your submission entitled "HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION THROUGH THE HUMAN BODY" has been assigned the following manuscript number: IJID-D-10-00737

The Corresponding Editor dealing with your manuscript is Bill Cameron, MD. This Editor will arrange suitable reviewers and will inform you when a decision has been reached, typically within three months of when the manuscript was submitted.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial System as an author via the url <http://ees.elsevier.com/ijid>

Thank you for submitting your work to the journal.

Kind regards,

Bill Cameron, MD

Editor-in-Chief

International Journal of Infectious Diseases