



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELIZA PIZARRO CASTILHA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE
DELEÇÃO APOBEC3A/B NA INFECÇÃO PELO HPV, NO
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES INTRAEPITELIAIS
CERVICAIS E DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO**

Londrina
2022

ELIZA PIZARRO CASTILHA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE
DELEÇÃO APOBEC3A/B NA INFECÇÃO PELO HPV, NO
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES INTRAEPITELIAIS
CERVICAIS E DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Brajão de Oliveira

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C352i Castilha, Eliza Pizarro.
Investigação da associação do polimorfismo de deleção APOBEC3A/B na infecção pelo HPV, no desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e de câncer de colo de útero / Eliza Pizarro Castilha. - Londrina, 2022.
62 f. : il.

Orientador: Karen Bração de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Papilomavírus humano - Tese. 2. Variantes genéticas - Tese. 3. Marcadores moleculares - Tese. 4. Desaminases APOBEC - Tese. I. Oliveira, Karen Bração de . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

ELIZA PIZARRO CASTILHA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE
DELEÇÃO APOBEC3A/B NA INFECÇÃO PELO HPV, NO
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES INTRAEPITELIAIS
CERVICAIS E DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Karen Brajão de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ligia Carla Faccin Galhardi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 05 de maio de 2022.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Karen Brajão de Oliveira pelo intenso aprendizado que obtive sob sua orientação, pelo acolhimento dentro de sua equipe e pelo cuidado, disponibilidade e atenção que permitiram a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinador, Prof^a. Dr^a. Roberta Losi Guembarovski e Prof^a. Dr^a. Ligia Carla Faccin Galhardi, pela disponibilidade e colaboração com o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e a Universidade Estadual de Londrina, pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional à Capes, CNPq e Fundação Araucária, e a PROPPG-UEL, pelo apoio financeiro para realização do projeto.

Aos Centros de Saúde Municipal Dr. Justiniano Clímaco da Silva (UBS Vivi Xavier) e Dr. Paulo Roberto Moita da Silva (UBS Armindo Guazzi), à Clínica de Colposcopia do CISMENPAR e ao Ambulatório de Ginecologia do HC/HU/UEL, pelo auxílio na obtenção das amostras. Agradeço as pacientes que viabilizaram a realização deste estudo através da participação voluntária e doação das amostras.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Molecular e Imunologia (LAGMI), Kléber, Janaina, Thailla e especialmente a Rafaela e Nádia que dividiram não apenas a bancada de trabalho, mas sempre dispuseram de seu tempo e experiência para me ensinar, discutir e sanar desde as dúvidas mais básicas até as mais complexas.

Aos meus colegas de turma de Mestrado, que compartilharam suas experiências e tornaram as disciplinas mais acaloradas e enriquecedoras. Em particular a Beatriz Kalocsay, pela parceria nos momentos mais estressantes, por tornar muito mais leve essa jornada e por transcender o espaço acadêmico.

A todos os meus professores, que foram fundamentais para minha formação como ser humano ao me instigar e desafiar durante todos esses anos, a todos que de diferentes formas me despertaram o desejo pelo ensino.

À minha família, que esteve presente desde o primeiro passo dessa trajetória, que vibraram e sofreram como uma extensão de mim. Aos meus pais, Alissandra e Milton, muito obrigada pelo alicerce, incentivo, acolhimento e apoio de todas as formas. A minha irmã, Audrey, agradeço sua parceria infindável nesse percurso, estaremos sempre juntas integralmente. Agradeço ao Flávio, pela convivência, pelas discussões e experiências compartilhadas, pelo presente e pelas aventuras futuras.

Aos meus amigos, Fernanda, Stephane, Letícia e Fernando, pela presença e pelo escape da rotina que me proporcionam em nossos encontros, muito obrigada pela felicidade de compartilhar com vocês as minhas vitórias.

CASTILHA, Eliza Pizarro. **Investigação da associação do polimorfismo de deleção APOBEC3A/B na infecção pelo HPV, no desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e de câncer de colo de útero.** 2022. 62 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O papilomavírus humano (HPV) gera uma infecção sexualmente transmissível que é majoritariamente assintomática, mas pode gerar diferentes graus de lesões cervicais de acordo com a competência imunológica do indivíduo, do tipo viral envolvido e da persistência da infecção. Variações em componentes do sistema imune, como nos genes da Enzima de Edição do mRNA da Apolipoproteína B (APOBEC), podem alterar essa resposta. O polimorfismo híbrido de deleção APOBEC3A/B (A3A/B) fornece uma atividade mutagênica para a proteína A3A, que é relatada no câncer cervical. Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a associação do polimorfismo A3A/B com a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e do câncer de colo de útero em mulheres atendidas pelo serviço público de saúde na região Norte do Paraná, Brasil. Foram coletadas amostras de sangue periférico e secreção cervical para a extração de DNA genômico, que foi utilizado para genotipagem do polimorfismo A3A/B (Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) alelo-específico) e caracterização quanto a presença do HPV (PCR convencional). Análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS *Statistics* adotando-se o nível de significância de $p < 0.05$. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE 05505912.0.0000.5231). Foram incluídas no estudo 369 mulheres pelo critério de amplificação para o polimorfismo, estas foram agrupadas inicialmente quanto a presença da infecção pelo HPV. O grupo com infecção pelo HPV foi subdividido de acordo com o grau de lesão em sem lesão, Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LIEBG), Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (LIEAG) e câncer cervical. Mediante a análise das características sociodemográficas e de comportamento sexual e reprodutivo incluídas no estudo (idade, tabagismo, renda mensal, uso de contraceptivos, uso de preservativos e sexarca), observamos que mulheres com ensino fundamental incompleto e que recebiam menos de um salário-mínimo eram mais suscetíveis ao desenvolvimento de LIEAG e câncer cervical, evidenciando limitações por fatores socioculturais. Em relação ao polimorfismo A3A/B, a distribuição dos genótipos homocigoto para o alelo selvagem, homocigoto para o alelo variante e heterocigoto foi equivalente entre os grupos e subgrupos analisados. Não houve diferenças significativas quanto a presença da infecção ou desenvolvimento de lesões, mesmo após exclusão de fatores confundidores. Esse resultado não exclui totalmente a associação, pois a presença de mutações assinaturas de A3A são relatadas em células cancerosas, mas sugere que outros genes podem influenciar a malignização cervical. Além disso, a alta variabilidade gênica pela miscigenação da população estudada pode afetar o resultado da associação desse polimorfismo. Esse é o primeiro trabalho que avalia a associação do polimorfismo A3A/B com a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais e do câncer cervical em brasileiras da região sul, sendo indispensável para a caracterização social e genética dessas mulheres.

Palavras-chave: papilomavírus humano; variantes genéticas; marcadores moleculares; desaminases APOBEC; carcinoma cervical.

CASTILHA, Eliza Pizarro. **Investigation of the association of APOBEC3A/B deletion polymorphism in HPV infection, development of cervical intraepithelial lesions and cervical cancer.** 2022. 62 p. Dissertation (Master's in Experimental Pathology) - Department of Pathological Sciences, Biological Science Center – State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) generates a sexually transmitted infection that is mostly asymptomatic, but can generate different degrees of cervical lesions according to the individual's immunological competence, the viral type involved and the persistence of the infection. Variations in immune system components, such as apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide like (APOBEC) genes, can alter this response. The APOBEC3A/B (A3A/B) deletion hybrid polymorphism provides a mutagenic activity for the A3A protein, which is reported in cervical cancer. In view of the above, the objective of this study was to evaluate the association of the A3A/B polymorphism with HPV infection and the development of cervical intraepithelial lesions and with cervical cancer in women assisted by the Unified Health System (SUS) in the region. Northern Paraná, Brazil. Peripheral blood and cervical secretion samples were collected for the extraction of genomic DNA, which was used for genotyping the A3A/B polymorphism (Allele-specific Polymerase Chain Reaction (PCR)) and characterization for the presence of HPV (conventional PCR). Statistical analyzes were performed using the SPSS Statistics software, adopting a significance level of $p < 0.05$. The project served the ethics committee in research with human beings at the State University of Londrina (CAAE 05505912.0.0000.5231). 369 women were included in the study by the amplification criterion for the polymorphism, they were initially grouped according to the presence of HPV infection. The group with HPV infection was subdivided according to the degree of lesion into no lesion, Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL), High Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) and cervical cancer. By analyzing the sociodemographic and significant sexual and reproductive behavior characteristics included in the study (age, ethnicity, smoking, monthly income, contraceptive use, condom use and sexarche), we observed that non-Caucasian women, with incomplete primary education and receiving less than one minimum wage were more susceptible to the development of HSIL and cervical cancer, evidencing limitations due to sociocultural factors. Regarding the A3A/B polymorphism, the distribution of the genotypes homozygous for the wild allele, homozygous for the variant allele and heterozygote was equivalent between the groups and subgroups analyzed. There were no significant differences in the presence of infection or development of lesions, even after excluding confounding factors. This result does not totally rule out the association, as the presence of A3A signature mutations are reported in cancer cells, but suggests that other genes may influence cervical malignancy. In addition, the high genetic variability due to miscegenation of the population studied may affect the result of the association of this polymorphism. This is the first study that evaluates the association of the A3A/B polymorphism with HPV infection and the development of intraepithelial lesions and cervical cancer in Brazilian women from the southern region, being essential for the social and genetic characterization of these women.

Key words: human papillomavirus; genetic variants; molecular markers; APOBEC deaminases; cervical carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação entre o genoma do HPV de alto risco (HPV-AR) e do HPV de baixo risco (HPV-BR).....	14
Figura 2 - Estrutura e características funcionais das APOBECs	20
Figura 3 - Desaminação de citidinas	21
Figura 4 - Mutagênese mediada por APOBEC3A	25
Figura 5 - Estrutura do polimorfismo de deleção APOBEC3A/B	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AID	Desaminase induzida por ativação
ApoB48	Apolipoproteína B48
APOBEC	Enzima de Edição do mRNA da Apolipoproteína B semelhante a polipeptídeo catalítico
APOBEC3A/B	Híbrido de deleção APOBEC3A e APOBEC3B
AR	Alto risco
ATP	Adenosina trifosfato
BER	Reparo por excisão de base
BR	Baixo Risco
C	Citosina/Citidina
CD	Domínio Catalítico
CDK2	Ciclina dependente de quinase 2
CI	Intervalo de confiança
del	Alelo variante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Trifosfato de desoxirribonucleotídeo
DSB	Quebras de fita dupla
E	Região de codificação precoce
E2F	Fator de ligação ao promotor E2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
Fas	Receptor de morte da superfície celular Fas
G	Guanina
HCL	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus Humano
HSPG	Sulfato de heparina da membrana celular
ins	Alelo selvagem
IST	Infecção sexualmente transmissível
L	Região de codificação tardia
LAGMI	Laboratório de Genética Molecular e Imunologia
LCR	Região de controle longa

LIEAG	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
LIEBG	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Razão de chances (Odds Ratio)
ORF	Fase de leitura aberta
p53	Proteína supressora de tumor 53
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIK3CA	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa
pRb	Proteína do Retinoblastoma
RNA	Ácido Ribonucleico
ssDNA	DNA de fita simples
SUS	Sistema único de saúde
T	Timina
TCGA	Atlas do Genoma do Câncer
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tris-EDTA
TERT	Transcriptase Reversa da Telomerase
TLR	Receptores do tipo Toll
U	Uridina/Uracila
UBS	Unidade Básica de Saúde
UNG	Uracil-DNA-glicosilase
UTR	Região não traduzida
VIF	Fator de infectividade viral
ZDD	Desaminase dependente de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	12
2.1	GENOMA VIRAL	13
2.2	PROTEÍNAS VIRAIS	15
2.3	CARCINOGENESE MEDIADA PELO HPV-AR	18
3	SUPERFAMÍLIA APOBEC	20
3.1	HIPERMUTAÇÃO NO GENOMA CELULAR	24
3.2	POLIMORFISMO APOBEC3A/B (A3A/B)	27
4	OBJETIVOS	30
4.1	OBJETIVO GERAL	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
4	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	39
5	CONCLUSÃO	59
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	APÊNDICES	61
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	61
	APÊNDICE B – Questionário Sócio-epidemiológico	62
	ANEXOS	63
	ANEXO A – Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/UEL	63

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é a mais comum a acometer o trato reprodutivo de homens e mulheres e tem uma incidência mundial (WHO, 2020).

A maioria dos indivíduos imunocompetentes infectados pelo HPV são assintomáticos ou portadores de lesões benignas como verrugas genitais ou condiloma acuminado. Em 90% dos casos, a eliminação do vírus ocorre espontaneamente em até dois anos após o contato inicial (DELLA FERA et al., 2021).

A persistência da infecção no colo uterino corrobora com o aumento da propensão ao estabelecimento de lesões, pela ação indireta de proteínas oncogênicas virais e pelo microambiente inflamatório crônico, que podem predispor alterações neoplásicas de forma dependente do tipo viral envolvido e das características imunogenéticas do hospedeiro (DOORBAR, 2018).

Mutações em elementos envolvidos na resposta imune contra o HPV, como nos genes que codificam a Enzima de Edição do mRNA da Apolipoproteína B (APOBEC), podem alterar a suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões e mutagênese induzida pelo vírus (REVATHIDEVI et al., 2021).

Deste modo, este trabalho se propõe a avaliar a associação do polimorfismo de deleção APOBEC3A/B na infecção pelo HPV e no desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e do câncer de colo de útero.

2. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Papilomavírus humano (HPV) pertence à família *Papillomaviridae* e foram descritos aproximadamente 450 tipos definidos através do sequenciamento da região L1 do genoma viral, onde uma similaridade <90% com os tipos já identificados caracteriza um novo tipo. Estes vírus podem ser classificados filogeneticamente em gêneros – Alfa, Beta, Gama, Mu e Nu – e de acordo com o potencial carcinogênico (GHEIT, 2019; MCBRIDE, 2022).

As características do genoma viral e a capacidade de interação com o epitélio determinam o potencial carcinogênico, visto que todos os HPVs são capazes de infectar o epitélio cutâneo, mas apenas os HPVs de alto risco (HPV-AR) presentes no gênero alfa são capazes de interagir com o epitélio mucoso, favorecendo a infecção e posterior lesão preditora do câncer (GHEIT, 2019). Os demais tipos de HPVs são classificados em HPV de risco indeterminado (HPV-RI) e de baixo risco (HPV-BR),

1 sendo capazes de gerar lesões benignas como condiloma acuminado (verrugas
2 genitais) ou infecções assintomáticas autolimitadas em indivíduos imunocompetentes,
3 os HPVs-BR mais relatados são os 6 e 11 (DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018;
4 DOORBAR, 2018).

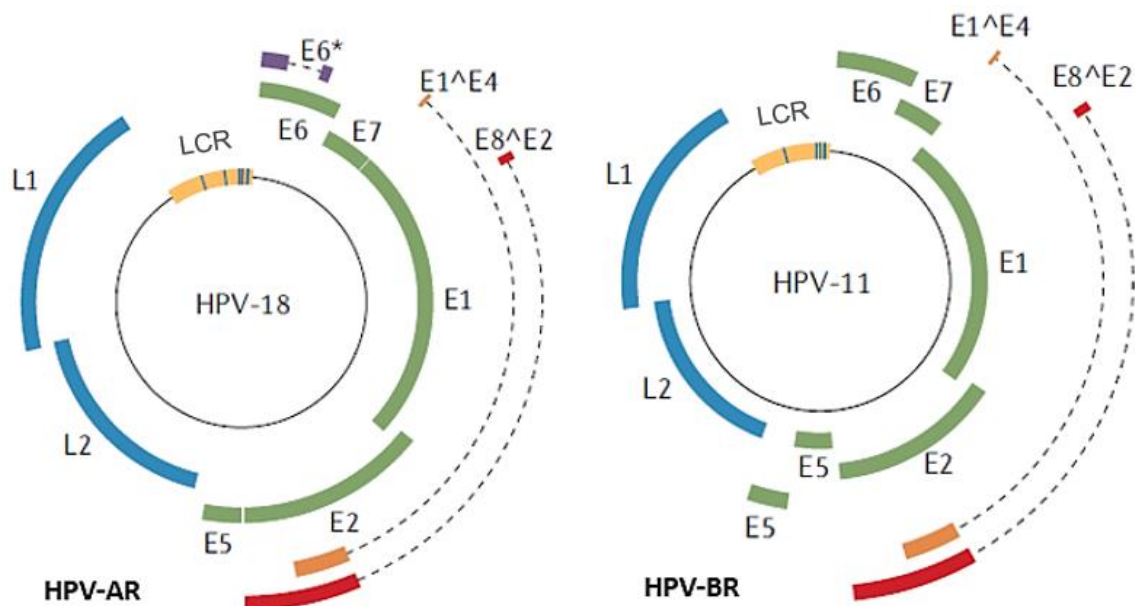
5 Os tipos HPV-AR mais frequentemente relacionados ao câncer cervical no
6 mundo são HPV16 e 18, que juntos representam 71% dos casos. Outros tipos
7 relevantes como agentes etiológicos determinados pela OMS, são HPV31, 33, 35, 39,
8 45, 51, 52, 56, 58 e 59 (DE MARTEL et al., 2017; DOORBAR et al., 2012). Outros
9 tipos de neoplasias também estão relacionados com a infecção pelo HPV-AR como
10 de cabeça e pescoço, vagina, vulva, anus e pênis (GHEIT, 2019).

11 2.1. GENOMA VIRAL

12 Estruturalmente, o HPV é um vírus não envelopado constituído por um
13 capsídeo proteico icosaédrico com 50 a 55 nm de diâmetro, que abriga um DNA em
14 dupla fita circular composto por aproximadamente 8000 pares de bases (pb)
15 (AMADOR-MOLINA et al., 2013; ARALDI et al., 2018).

16 O genoma viral está organizado em um segmento longo não codificante,
17 denominado Região de Controle Longa (*Long Control Region – LCR*), responsável
18 pela replicação e transcrição viral, e em fases de leitura aberta (*Open Reading Frames*
19 – ORFs) que são divididas em região de codificação precoce (*Early – E*), que codifica
20 as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 envolvidas no controle do ciclo reprodutivo viral
21 e modulação da expressão gênica, imune e do ciclo celular do hospedeiro, e a região
22 de codificação tardia (*Late – L*), que codifica as proteínas estruturais maior e menor
23 do capsídeo viral, L1 e L2 (AMADOR-MOLINA et al., 2013; GHEIT, 2019; HONG;
24 LAIMINS, 2017).

25 O genoma do HPV-AR difere do HPV-BR pela presença de um segmento
26 adicional do gene E5 capaz de codificar uma das quatro proteínas desse gene, além
27 disso em HPV-AR as proteínas E6 e E7 são transcritas a partir de um único RNA
28 mensageiro (mRNA) policistrônico que ao passar pelo *splicing* alternativo origina
29 também a proteína E6* (Figura 1) (MCBRIDE, 2022).



1
 2 **Figura 1. Comparação entre o genoma do HPV de alto risco (HPV-AR) e do HPV de baixo risco**
 3 **(HPV-BR).** Genoma do HPV composto por um DNA circular em dupla fita com 8000 pares de bases
 4 organizadas em fases de leitura aberta com genes de codificação precoce designados como E (verde)
 5 e de codificação tardia, designados como L (azul) e uma região reguladora não codificante (LCR).
 6 Principais transcritos provenientes de *splicing* E1^E4 (laranja), E8^E2 (vermelho) e E6* (roxo) que é
 7 expresso exclusivamente em HPVs de alto risco. Adaptado de MCBRIDE, 2022.

8 A expressão desses genes é altamente regulada em nível transcricional e de
 9 processamento de RNA, principalmente através do *splicing* alternativo e
 10 poliadenilação de mRNA viral, que permitem a regulação individual dos genes
 11 expressos durante o ciclo viral (SCHWARTZ, 2013).

12 As proteínas virais são diferencialmente expressas nas camadas do epitélio
 13 escamoso estratificado cervical, pois a expressão gênica do HPV acontece de forma
 14 dependente do ciclo de renovação dessas células (AMADOR-MOLINA et al., 2013).
 15 O epitélio cervical possui uma camada de células basais com a propriedade de divisão
 16 assimétrica, onde apenas uma das células filhas sofre a diferenciação terminal até ser
 17 liberada na superfície e completar o ciclo de renovação (MCBRIDE; WARBURTON,
 18 2017). No início da infecção o estímulo para replicação viral é proveniente dos fatores
 19 de transcrição celulares gerados para a divisão da célula basal indiferenciada, que
 20 despropositadamente estimulam os genes precoces do vírus E1 e E2 a gerarem um
 21 baixo número de cópias do genoma do HPV. De forma concomitante ao
 22 amadurecimento do epitélio, nas células parabasais ocorre a perda de estímulos
 23 replicativos e de diferenciação celular, o HPV passa então a utilizar a maquinaria de
 24 reparo do DNA celular como ferramenta para a amplificação do seu genoma e síntese
 25 de altos níveis de DNA viral pela expressão de E4-E7. A montagem dos vírions

1 acontece mediante a expressão dos genes tardios, L1 e L2, e sua liberação é
2 resultante da descamação das camadas superficiais do epitélio (DELLA FERA et al.,
3 2021).

4 2.2. PROTEÍNAS VIRAIS

5 O genoma viral então, por meio de suas ORFs, codifica diferentes proteínas
6 que atuam em diferentes fases do ciclo replicativo do vírus, as quais estão descritas
7 abaixo e apresentadas no quadro 1.

8 As proteínas E1 e E2 atuam em diferentes fases do ciclo de infecção do HPV,
9 sendo essenciais para manter o número de cópias do vírus na forma epissomal
10 constante após a infecção dos queratinócitos basais (replicação de estabelecimento),
11 para a manutenção das cópias genômicas extracromossomais em células basais
12 indiferenciadas (persistência da infecção) e para promover a produção de vírions
13 (replicação viral produtiva) em células parabasais diferenciadas do epitélio
14 (BERGVALL; MELENDY; ARCHAMBAULT, 2013; GHEIT, 2019).

15 A proteína E1 favorece a replicação do HPV ao atuar como helicase
16 desenrolando a origem da replicação do vírus de forma dependente de adenosina
17 trifosfato (ATP), pode se ligar diretamente a quinase dependente de ciclina 2 (CDK2),
18 promove quebras na cromatina da célula hospedeira que contribuem para a
19 integração viral e ao formar um complexo de iniciação de alta afinidade com a proteína
20 E2 é capaz de se ligar a origem de replicação em LCR e induzir o recrutamento de
21 proteínas necessárias para a replicação viral (AMADOR-MOLINA et al., 2013; ARALDI
22 et al., 2018; MCBRIDE, 2022).

23 A proteína E2 além de recrutar E1 para a origem de replicação, também pode
24 se ligar em regiões regulatórias e ativar ou reprimir a transcrição viral, sendo essencial
25 para a persistência da infecção (MCBRIDE, 2022). A perda de E2 por mutações ou
26 durante a integração do genoma viral ao DNA da célula hospedeira leva a expressão
27 ativa de E6 e E7, e conseqüentemente, proliferação e transformações celulares que
28 também são favorecidas por sua regulação epigenética que reduz a atividade da
29 proteína supressora de tumor 53 (p53) (AMADOR-MOLINA et al., 2013; ARALDI et
30 al., 2018). E2 também favorece o empacotamento do genoma viral, entretanto não é
31 um fator essencial (MCBRIDE, 2013).

1 E4 é a proteína mais expressa na fase tardia do ciclo viral que precede a
2 expressão das proteínas do capsídeo, está presente principalmente nas camadas
3 suprabasal e granular do epitélio (ARALDI et al., 2018). A proteína E4 contribui
4 indiretamente para a amplificação do genoma viral por induzir a parada do ciclo celular
5 em G2 em células diferenciadas e está envolvida com a liberação e transmissão viral
6 por levar a fragilidade celular ao interagir com filamentos de queratina do citoesqueleto
7 (ARALDI et al., 2018; DOORBAR, 2013; MCBRIDE, 2022).

8 As proteínas E5 são oncoproteínas transmembranas localizadas no retículo
9 endoplasmático, capazes de promover a carcinogênese através do estímulo da
10 proliferação celular pela ativação das vias de sinalização epidérmica que ocorre
11 através da diminuição da degradação endossomal do receptor do fator de crescimento
12 epidérmico (EGFR), devido ao aumento de pH endossomal resultante da interação de
13 E5 com a próton-ATPase (ARALDI et al., 2018). A promoção da carcinogênese por
14 essa proteína também ocorre por meio do aumento da sobrevivência celular através
15 de diferentes mecanismos de inibição de apoptose, como a degradação de Receptor
16 de morte da superfície celular Fas (Fas) e inibição da formação do domínio de morte
17 (DIMAIO; PETTI, 2013; PAL; KUNDU, 2020). E5 modula a replicação celular em uma
18 fase tardia, entretanto não é indispensável para o ciclo viral. Também afeta a
19 comunicação célula-célula ao promover a desfosforilação de proteínas de junções
20 comunicantes. Além disso, afeta a expressão do complexo principal de
21 histocompatibilidade (MHC) de classe I e a maturação do MHC de classe II,
22 fornecendo um papel de evasão imune em lesões cancerosas (DIMAIO; PETTI, 2013;
23 MCBRIDE, 2022).

24 As oncoproteínas E6 e E7 alteram a atividade de supressores do ciclo celular
25 gerando mutações que afetam a integridade da célula do hospedeiro e culminam na
26 reentrada do ciclo, resultando na proliferação das camadas basais e parabasais,
27 transformação e imortalização celular (DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018;
28 DOORBAR, 2018). A atividade mais significativa de E6 é a evasão da apoptose pela
29 degradação proteassomal do p53, que ocorre por ubiquitinação através do complexo
30 E6/E6AP/p53, favorecendo a proliferação celular descontrolada e contínua (PAL;
31 KUNDU, 2020; VATS et al., 2021). Outra ação de E6 é a inibição da senescência
32 celular nos queratinócitos ao preservar a telomerase pela ativação do promotor gênico
33 transcriptase reversa da telomerase (TERT), fornecendo uma vantagem replicativa

1 para o vírus e maior probabilidade de malignização celular (VANDE POL;
 2 KLINGELHUTZ, 2013). A proliferação celular induzida por E7 ocorre pela
 3 desrepressão do ciclo celular mediante a fosforilação da proteína do retinoblastoma
 4 (pRb) que leva a liberação de fatores de transcrição como Fator de ligação ao
 5 promotor E2 (E2F) para o núcleo e a condução do ciclo celular para a fase S (PAL;
 6 KUNDU, 2020). E7 também gera quebras de DNA e reduz o reparo, favorecendo a
 7 instabilidade genômica e mutações celulares. Ambas E6 e E7, contribuem nos
 8 estágios iniciais e tardios da carcinogênese e promovem a evasão imunológica ao
 9 diminuir a expressão de receptores do tipo Toll (TLR) em fagócitos (ARALDI et al.,
 10 2018).

11 As proteínas estruturais do capsídeo são essenciais para a infecção das células
 12 basais, sendo L1 responsável pela ligação do vírion aos proteoglicanos de heparam
 13 Sulfato (HSPG) da membrana celular, que gera uma mudança conformacional no
 14 capsídeo expondo L2 à furina convertase que promove a proteólise de L2 permitindo
 15 a ligação do vírion a um segundo receptor na membrana, possivelmente integrina
 16 $\alpha\beta4$, que culmina na internalização do vírus (BUCK; DAY; TRUS, 2013; DOORBAR
 17 et al., 2012; OZBUN, 2019). A proteína L2 favorece a translocação do vírus para o
 18 núcleo na forma epissomal, que passa a realizar uma replicação de estabelecimento
 19 junto com o genoma da célula, mediante ação de E1 e E2. Ambas L1 e L2, expressas
 20 durante a montagem e liberação dos vírions, são responsáveis pela formação do
 21 capsídeo entorno dos genomas recém replicados (GHEIT, 2019).

22

PROTEÍNAS	FUNÇÕES NO CICLO VIRAL	INTERAÇÃO COM A CÉLULA HOSPEDEIRA
E1	Helicase; Ligação na origem de replicação viral	Quebras na cromatina da célula hospedeira
E2	Ativação ou repressão da transcrição viral; Inibição da expressão de E6 e E7	Liga o DNA viral a cromatina do hospedeiro
E4	Altamente expressa; promove amplificação do genoma viral no estágio produtivo	Parada do ciclo celular em G2 em células diferenciadas; promove fragilidade do citoesqueleto
E5	Promove estágios produtivos da infecção; Oncoproteína	Ativação da proliferação celular via EGFR; inibição da apoptose por degradação de receptor Fas; evasão imune por inibição de MHC

E6	Oncoproteína; manutenção da forma episossomal estável	Gera evasão da apoptose pela degradação proteossomal de p53 e inibição da senescência celular pela ativação de TERT
E7	Oncoproteína; manutenção da forma episossomal estável	Promoção do ciclo celular através da fosforilação de pRb
L1	Proteína maior do capsídeo	Infecção da célula pela interação com HSPG na membrana celular
L2	Proteína menor do capsídeo	Infecção da célula pela interação com receptores de membrana; Translocação do vírus para o núcleo

1 Quadro 1. **Proteínas do HPV: funções e interação celular.** E, região de codificação precoce; EGFR, receptor do fator de crescimento epidérmico; Fas, Receptor de morte da superfície celular Fas; HSPG, Proteoglicano de heparam sulfato; L, região de codificação tardia; MHC, Complexo principal de histocompatibilidade; p53, proteína supressora de tumor 53; pRb, Proteína do Retinoblastoma; TERT, Transcriptase Reversa da Telomerase. Adaptado de GHEIT, 2019; MCBRIDE, 2022.

6

7 2.3. CARCINOGENESE MEDIADA PELO HPV-AR

8 O câncer cervical é o quarto tipo mais comum em mulheres no mundo e o
9 terceiro no Brasil, representando 7,4% dos casos em brasileiras estimados para 2020
10 e 2021 (INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; WHO, 2020). Mulheres de baixa e
11 média renda, que são a maioria em países subdesenvolvidos como o Brasil,
12 representam 87% dos casos de morte (SOERJOMATARAM; BRAY, 2021) e a
13 Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a carga global desta neoplasia
14 deve aumentar 21% no número de casos e 27% no número de mortes até 2030 nesta
15 mesma população (WHO, 2020).

16 O HPV é o agente etiológico necessário para a tumorigênese cervical, estando
17 relacionado a 99,7% dos casos, sendo capaz de induzir transformações que geram
18 lesões intraepiteliais que evoluem para o carcinoma *in situ* (SCHIFFMAN;
19 WENTZENSEN, 2013). A progressão para o câncer cervical com fenótipo invasivo
20 depende da associação de cofatores genéticos, hormonais, imunológicos,
21 socioeconômicos e de hábitos, dessa forma os casos que progridem para malignidade
22 são uma minoria (CURTI et al., 2022; GHEIT, 2019).

23 A classificação citológica brasileira adotada é o sistema de Bethesda, onde as
24 lesões podem ser categorizadas em lesões intraepiteliais de baixo grau (LIEBG, em
25 inglês *LSIL*) e lesões intraepiteliais de alto grau (LIEAG, em inglês *HSIL*) (INCA;
26 MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

1 A transmissão do HPV-AR ocorre por meio do contato pele-pele, pele-mucosa
2 ou mucosa-mucosa predominantemente durante relações sexuais que expõem as
3 células germinativas da camada basal ao vírus através de micro lesões no epitélio
4 (GHEIT, 2019; SCHIFFMAN et al., 2016). O vírus nos queratinócitos basais pode ser
5 eliminado ou estabelecer um reservatório de células infectadas, podendo permanecer
6 latente por décadas ou integrar-se ao genoma da célula, exclusivamente os HPV-AR,
7 e corromper o ciclo de vida e diferenciação celular por aumentar os danos no DNA,
8 inibir o reparo e a apoptose, estimular a proliferação e desregular a expressão de
9 oncogenes (BORDIGNON et al., 2017; MCBRIDE, 2022). Dessa forma, o HPV
10 participa direta e indiretamente de todas as etapas da carcinogênese: iniciação,
11 promoção, progressão e metástase (ARALDI et al., 2018).

12 As oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV-AR induzem a imortalidade e a
13 proliferação celular, por mecanismos anteriormente descritos, que levam a erros na
14 replicação do DNA, acúmulo de anormalidades cromossômicas e instabilidade
15 genômica que culminam em mutações iniciadoras irreversíveis (ARALDI et al., 2018;
16 DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018). A desrepressão dessas oncoproteínas é
17 frequentemente associada a interrupção do gene E2 pelo processo de integração do
18 HPV no DNA do hospedeiro (DELLA FERA et al., 2021). Essa integração acontece
19 como consequência acidental da proximidade entre o genoma viral e regiões
20 transcricionalmente ativas ou sítios frágeis comuns no DNA do hospedeiro, frequentes
21 na fase de amplificação do ciclo replicativo do vírus (MCBRIDE; WARBURTON, 2017)

22 A expansão clonal de células neoplásicas, promoção e a progressão,
23 dependem da desregulação do metabolismo celular que é favorecida pela ação das
24 oncoproteínas do HPV-AR (ARALDI et al., 2018). A persistência da infecção é outro
25 fator que contribui para o processo carcinogênico na zona de transformação, pois
26 fornece um microambiente inflamatório crônico (SADRI NAHAND et al., 2020;
27 SCHIFFMAN et al., 2007).

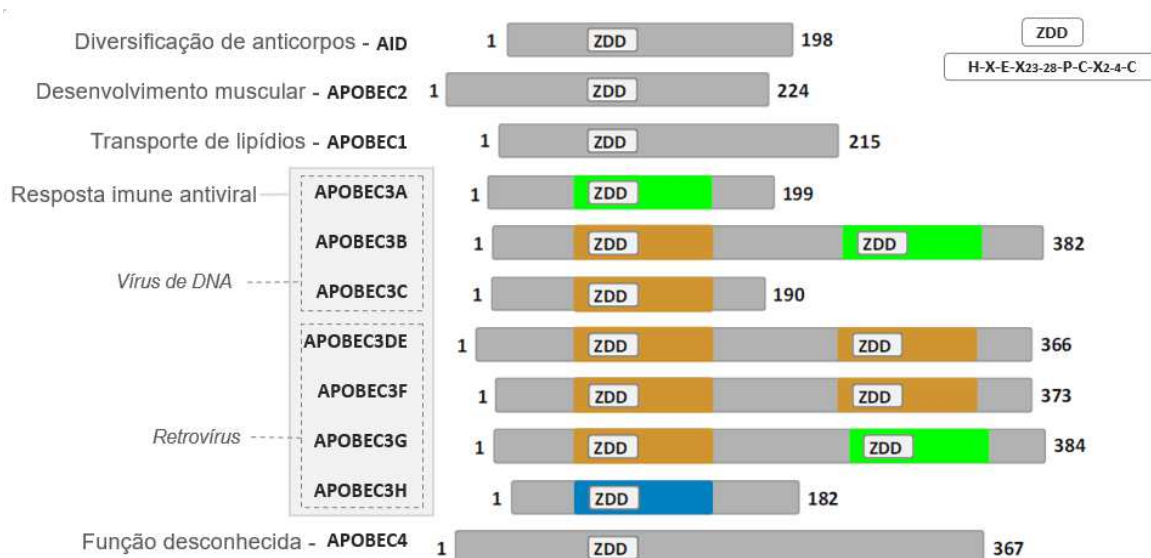
28 No processo de metástase a célula neoplásica adquire um fenótipo invasivo
29 que necessita de alterações em nível morfológico, metabólico e genético (ARALDI et
30 al., 2018). Além das alterações que promovem a proliferação e anulam *checkpoints*
31 do ciclo celular, inibição de proteína supressora de tumor 53 (p53) e proteína do
32 retinoblastoma (pRb) por exemplo, padrões de mutações compatíveis com a atividade
33 de proteínas do sistema imune, como Enzima de Edição do mRNA da Apolipoproteína

1 B (APOBEC), estão sendo relacionados ao câncer de mama (VITIELLO et al., 2020),
 2 cervical (REVATHIDEVI et al., 2021) e de cabeça e pescoço (FADEN et al., 2019),
 3 evidenciando uma possível fonte de alterações genéticas que pode ser estimulada
 4 pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV-AR (DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018).

5 3. SUPERFAMÍLIA APOBEC

6 A superfamília APOBEC é composta por 11 genes que incluem desaminase
 7 induzida por ativação (AID) e APOBEC1, no cromossomo 12, APOBEC2, no
 8 cromossomo 6, APOBEC4, presente no cromossomo 1, e o grupo APOBEC3 (A3)
 9 formado pelos genes APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3DE,
 10 APOBEC3F, APOBEC3G e APOBEC3H, presentes no cromossomo 22 (CHEN et al.,
 11 2017; GREEN; WEITZMAN, 2019; HENDERSON; FENTON, 2015; REVATHIDEVI et
 12 al., 2021; RIVA et al., 2021; SALTER; BENNETT; SMITH, 2016).

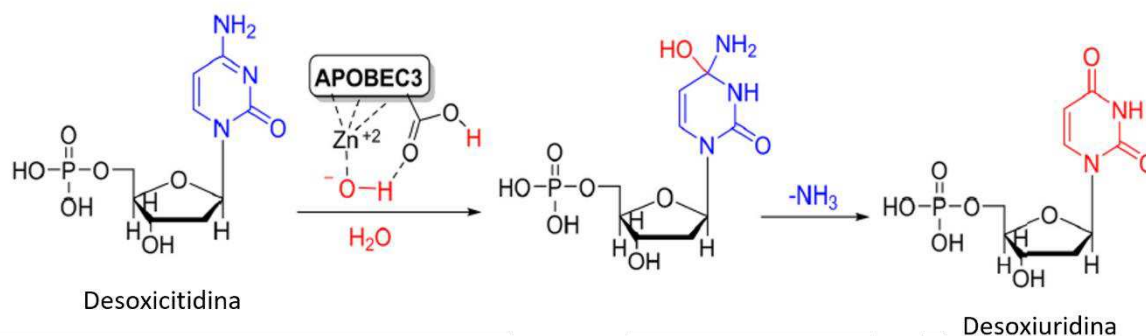
13 Os genes APOBECs codificam enzimas de mesmo nome, que são
 14 estruturalmente semelhantes e possuem domínios catalíticos (CD) formados por
 15 desaminases dependentes de zinco (ZDD), determinados por sequências de
 16 aminoácidos conservados. Essas enzimas apresentam funções específicas de acordo
 17 com o tecido em que são expressas, participando de eventos imunes, metabólicos e
 18 de expressão gênica através da atividade de desaminação de citidina (CERVANTES-
 19 GRACIA et al., 2021; REVATHIDEVI et al., 2021) (Figura 2).



20
 21 Figura 2. **Estrutura e características funcionais das APOBECs.** Representação da estrutura das
 22 APOBECs contendo domínios catalíticos formados por desaminases dependentes de zinco (ZDD).
 23 Marcações em verde, laranja e azul representam variações da estrutura canônica de ZDD (histidina-X-
 24 ácido glutâmico-X₂₃₋₂₈-Prolina-Cisteína-X₂₋₄-Cisteína, sendo X qualquer aminoácido) que é mostrada no

1 canto superior direito da figura. Função principal de cada APOBEC é mencionada a esquerda.
2 Adaptado de SALTER, 2016.

3 A desaminação de citidinas ocorre quando uma APOBEC catalisa a hidrólise
4 do grupo amino na posição 4 de uma citidina gerando uma uridina (C>U) em
5 sequências consenso específicas em fita simples de DNA (ssDNA) ou RNA (RIVA et
6 al., 2021; WARREN et al., 2017) (Figura 3).



7
8 **Figura 3. Desaminação de citidinas.** Representação da estrutura química do processo de
9 desaminação que ocorre através da hidrólise do grupo amino (NH₂) na posição 4 de uma desoxicidina
10 gerando uma desoxiuridina (C>U), catalisado pela enzima APOBEC. Adaptado de REVATHIDEVI et
11 al., 2021.

12
13 AID é expressa em células B ativadas nos centros germinativos com a função
14 de catalisar a recombinação e hipermutação somática no DNA genômico das regiões
15 variáveis de imunoglobulinas, permitindo a troca de classe e diversificação de
16 anticorpos fundamental para a imunidade adaptativa (REBHANDL et al., 2015).

17 APOBEC1 é expressa principalmente nos enterócitos do trato gastrointestinal
18 e é responsável pela edição pós-transcricional do mRNA do gene da apolipoproteína
19 B (APOB). APOBEC1 introduz um códon de parada prematuro (CAA>UAA), pela
20 modificação C>U, que resulta na terminação precoce da tradução, formando uma
21 proteína ApoB truncada contendo 48% da sequência original, denominada ApoB48.
22 Essa proteína participa do transporte de lipídeos dietéticos e integra a estrutura dos
23 quilomícrons (LO; COSCHIGANO, 2020; NAKAJIMA et al., 2014).

24 APOBEC2 está relacionada com a diferenciação e desenvolvimento muscular
25 adequado, sendo expressa principalmente no coração e músculos esqueléticos,
26 todavia a sua função específica não está bem estabelecida (SALTER; BENNETT;
27 SMITH, 2016; VIEIRA; SOARES, 2013). APOBEC4 é expressa principalmente nos
28 testículos, mas sua função também é desconhecida (REBHANDL et al., 2015).

1 A atividade das proteínas APOBEC3 (A3) integra a resposta imune inata a
2 infecções virais com o intuito de restringir a replicação e disseminação do
3 microrganismo agressor (URIU et al., 2021). O estímulo para a expressão dessas
4 proteínas inicia com o reconhecimento da partícula viral que acontece
5 majoritariamente por meio de TLR endossomais, que estimulam a expressão de
6 citocinas pró-inflamatórias e interferons do tipo I que são capazes de ativar a
7 expressão dos genes APOBEC3 (VIEIRA; SOARES, 2013).

8 A relação dessas proteínas de defesa com as famílias virais é heterogênea e
9 complexa, devido a variedade estrutural e mecanicista desses agentes patogênicos
10 (SADEGHPOUR et al., 2021). Além disso, a localização intracelular das proteínas A3
11 determina o alvo de restrição, sendo A3A, A3C e A3H nucleocitoplasmáticas,
12 enquanto A3B é predominantemente nuclear e A3DE, A3F e A3G citoplasmáticas
13 (SALTER; BENNETT; SMITH, 2016). Conseqüentemente, A3G, A3D, A3F e A3H são
14 altamente relacionadas como fatores de restrição para retrovírus e as proteínas A3A,
15 A3B e A3C restringem vírus de DNA, como o HPV (GREEN; WEITZMAN, 2019).

16 A atividade da A3 contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) é a mais
17 bem estabelecida na literatura, sendo A3G a principal proteína atuante na infecção e
18 a primeira a ser relatada como capaz de neutralizar o HIV em células T (SHEEHY et
19 al., 2002; URIU et al., 2021). No ciclo replicativo desse vírus ocorre a formação de um
20 DNA complementar (cDNA) ao RNA genômico viral por meio de uma transcrição
21 reversa. Durante este processo, A3G desamina uma citosina do cDNA gerando uma
22 uracila, conseqüentemente desencadeia a incorporação de uma adenina no DNA viral,
23 ou seja, A3G estabelece uma mutação G>A no genoma do HIV. O acúmulo dessas
24 mutações resulta na perda de informações genéticas e formação de vírions
25 defeituosos ou degradados, pela formação de códons de terminação (SADEGHPOUR
26 et al., 2021; URIU et al., 2021; VIEIRA; SOARES, 2013).

27 Um desfecho alternativo da interação entre A3G e HIV é o escape imunológico
28 através da ação da proteína de infectividade viral (Vif), que induz a degradação de
29 A3G pela via ubiquitina-proteassoma. Quando a neutralização de A3G é parcial, esta
30 e outras enzimas A3 (A3D, A3F, A3H) menos mutagênicas, se tornam fontes de
31 mutações não sinônimas no genoma viral, o que favorece a diversificação do HIV,
32 evolução e escape imune (SADEGHPOUR et al., 2021; SATO et al., 2014).

1 A atividade editora da A3 também é relatada para o HPV, sendo que ambas as
2 fitas de DNA desse vírus, em estados transitórios de fita simples durante a transcrição
3 ou replicação gênica, são suscetíveis a edição por A3A, A3B, A3C e A3H
4 (VARTANIAN et al., 2008; VIEIRA; SOARES, 2013). Estudos *in vitro* mostraram
5 hipermutação por A3A no LCR e nos genes E1 e E2 do HPV durante a fase inicial da
6 infecção (HIROSE et al., 2020; VARTANIAN et al., 2008), entretanto, isso não foi
7 correlacionado com uma atividade antiviral, provavelmente porque na fase produtiva
8 do ciclo o HPV encontra-se na forma episomal o que dificulta o acesso das APOBECs
9 ao ssDNA do vírus (WANG et al., 2014). Outro estudo sugere que A3A inibe
10 diretamente a infectividade do HPV em queratinócitos cervicais humanos, mas não
11 discorre sobre quais são os sítios de restrição para A3A e nem em quais estágios do
12 ciclo viral essa atividade é favorecida (WARREN et al., 2015).

13 A atividade antiviral de APOBEC pode não afetar diretamente o DNA viral, A3A
14 pode desaminar transcritos que codificam as proteínas L1 e L2 do capsídeo reduzindo
15 a infecciosidade do HPV (WARREN et al., 2017). A inibição da infectividade do HPV
16 também pode ocorrer por mecanismos independentes de desaminação, A3A pode se
17 ligar a proteína L1 do capsídeo e inibir a interação com a membrana celular (RIVA et
18 al., 2021).

19 Os trabalhos disponíveis na literatura atual não esclarecem se o HPV neutraliza
20 a resposta enzimática de A3 ou a manipula em prol da sua infectividade e oncogênese
21 (DELLA FERA et al., 2021). Se por um lado, infecções cervicais contendo genomas
22 do HPV com mutações assinaturas de A3 são mais suscetíveis a serem eliminadas
23 (DELLA FERA et al., 2021), por outro, a proteína E6 do HPV-AR é capaz de regular
24 positivamente a expressão do gene A3B e atividade de A3B em queratinócitos, sendo
25 necessária para manter a elevação de A3B em células cancerosas infectadas (VIEIRA
26 et al., 2014).

27 Existe a hipótese de que os HPV-AR não evoluíram para evadir da resposta de
28 A3, pois poderiam utilizar como forma de geração de diversidade genética viral
29 (WALLACE; MÜNGER, 2018; ZHU et al., 2020) (Figura 4). Isso é evidenciado pelo
30 fato de que apesar de muitas mutações induzidas por A3 serem deletérias ao vírus,
31 como a formação de códons de parada, outras são neutras ou aumentam a aptidão
32 viral pela substituição do aminoácido codificado. Além disso, nos queratinócitos
33 cervicais, os HPV-AR sofreram uma seleção lenta e aleatória pela restrição de A3, o

1 que resultou no esgotamento significativo de sequencias-alvo (TC) de A3 nesse vírus
2 (WARREN et al., 2015b).

3 Diferente do HIV, o HPV não possui uma proteína específica para evasão da
4 resposta imune, mas desenvolveu algumas estratégias para o estabelecimento de
5 uma infecção viral persistente. Os clones virais que são selecionados nesse contexto
6 possuem sítios de restrição para A3 reduzidos, tanto pelo esgotamento de sequencias
7 alvo, quanto pela integração ao genoma do hospedeiro o que diminui a porção de
8 ssDNA livre. A falta de acesso da A3 ao HPV pode contribuir para mutações somáticas
9 fora do alvo no genoma celular (CHEN et al., 2017; ZHU et al., 2020).

10 3.1. HIPERMUTAÇÃO NO GENOMA CELULAR

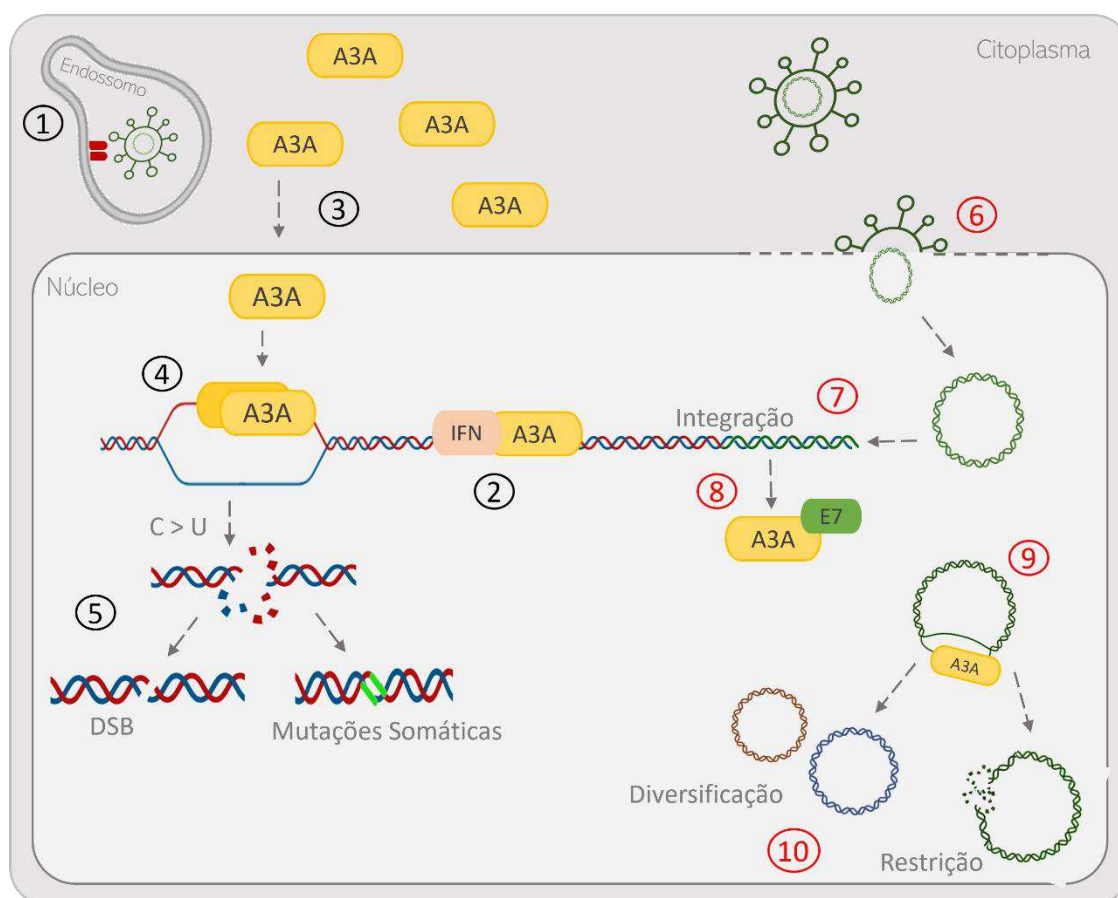
11 A hipermutação via desaminação executada pelas enzimas A3 na resposta
12 imune antiviral é sugerida também no genoma celular associado a alterações que
13 favorecem a progressão tumoral (GREEN; WEITZMAN, 2019).

14 Diferentes estudos relatam a associação entre a superexpressão de A3 com
15 cânceres humanos de bexiga, cervical, mama, cabeça/pescoço e pulmão (ARGYRIS
16 et al., 2021; CHEN et al., 2017; GREEN; WEITZMAN, 2019; HENDERSON; FENTON,
17 2015; REVATHIDEVI et al., 2021; RIVA et al., 2021; SALTER; BENNETT; SMITH,
18 2016). Os principais pontos que reforçam essa hipótese são a presença elevada de
19 mutações assinaturas (C>T) de A3A e A3B que ocorrem em proximidade e em curtas
20 sequencias do genoma (*kataegis*) de tecidos cancerosos, frequentes danos no DNA
21 nuclear por A3A e A3B e a expressão do mRNA dessas enzimas estão relacionados
22 com a carga mutacional em células cancerosas (GREEN; WEITZMAN, 2019;
23 WARREN et al., 2017).

24 A desaminação no DNA celular acontece majoritariamente durante estados
25 transitórios de fita simples que ocorrem durante a replicação, recombinação e
26 transcrição de genes (GREEN; WEITZMAN, 2019). A3A e A3B acessam a fita
27 descontínua de DNA, preferencialmente em 5'-TC (sendo C a citidina mutada), e
28 induzem a transição de citidina para uridina (WARREN et al., 2017). Essa alteração
29 pode gerar quebras no DNA genômico causando genotoxicidade, com ativação de
30 sinalizações para o reparo. A mutação é estabelecida no DNA quando o reparo por
31 excisão de base (BER) (remoção da uridina pela uracil-DNA-glicosilase (UNG) produz
32 um sítio abásico que é clivado por uma endonuclease) falha em substituir a uridina

1 por uma citidina antes da replicação seguinte, resultando na transição de C para T,
2 transversão C para G ou em quebras de fita dupla (DSB) (HENDERSON; FENTON,
3 2015) (Figura 4).

4 No câncer cervical, o estresse replicativo potencializa as mutações induzidas
5 por A3 e a expressão dessas enzimas nas células cancerosas é regulada
6 positivamente (GREEN; WEITZMAN, 2019). O descontrole do ciclo celular originado
7 pela integração do HPV-AR ao genoma do hospedeiro, gera um estresse replicativo
8 que aumenta a exposição do ssDNA celular tornando-o suscetível a restrição por A3
9 (RIVA et al., 2021; VIEIRA et al., 2014; WARREN et al., 2017). As oncoproteínas
10 desse vírus são capazes de regular positivamente A3B e A3A, E6 inativa p53
11 causando a desrepressão dos promotores do gene A3B e E7 inibe a degradação
12 proteossomal de A3A por uma mecanismo de estabilização de proteínas em
13 queratinócitos imortalizados (WESTRICH et al., 2018) (Figura 4).



14

15 **Figura 4. Mutagênese mediada por APOBEC3A.** Esquema da interação de APOBEC3A (A3A) com o
16 genoma celular a esquerda (números pretos) e com o DNA do Papilomavírus Humano (HPV) a direita
17 (números em vermelho). O reconhecimento do HPV nas vesículas endossomais por receptores do tipo
18 Toll (TLR) (1) induz a transcrição de interferons que estimulam a expressão dos genes A3A (2). A3A
19 citoplasmático é capaz de acessar o núcleo (3) e interagir com o DNA celular através da formação de

1 homodímeros (4). A3A desamina citocinas alvo (5'TC) no genoma que podem ser reparadas ou não,
2 gerando quebras de fita dupla (DSB) ou acúmulo de mutações somáticas (5) que favorecem alterações
3 celulares. O acesso nuclear do HPV de alto risco (HPV-AR) 6) pode resultar na integração ao DNA
4 celular o que gera a desrepressão de oncoproteínas como E7 (7). E7 é capaz de se associar a A3A e
5 impedir a sua degradação (8), favorecendo a interação dessa proteína com o DNA viral em estados
6 transitórios de fita simples (9). A desaminação do HPV por A3A visa eliminar o vírus por meio da
7 restrição, mas pode gerar evolução do genoma e diversidade viral quando as mutações provocadas
8 por A3A não são deletérias (10). Fonte: próprio autor.

9 Uma grande proporção de mutações G>A dispersas e agrupadas em vários
10 cânceres distintos são atribuídas a A3B (ARGYRIS et al., 2021; BURNS; TEMIZ;
11 HARRIS, 2013), sendo a principal mutações no gene da Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
12 3-quinase, subunidade catalítica alfa (PIK3CA) (WARREN et al., 2017). Entretanto
13 A3A é capaz de induzir 10 vezes mais mutações carcinogênicas no DNA do que A3B
14 em cânceres induzidos por HPV (CHAN et al., 2015; WARREN et al., 2017).

15 A quantidade de A3A intranuclear é proporcional a avidéz de ligação ao DNA.
16 A ligação de alta afinidade de A3A ao ssDNA é favorecida em níveis elevados dessa
17 proteína pela formação de homodímeros, logo baixas concentrações de A3A tendem
18 a ter menor associação com o DNA por estarem na forma monomérica (BOHN et al.,
19 2015). A3A é um potencial agente promotor de mutações quando consideramos que
20 a expressão constitutiva de A3A é significativamente maior no epitélio mucoso quando
21 comparada ao epitélio cutâneo (WARREN et al., 2017), e, como dito anteriormente,
22 que o HPV-AR favorece o aumento dessa expressão no epitélio cervical (GREEN;
23 WEITZMAN, 2019; WESTRICH et al., 2018) (Figura 4).

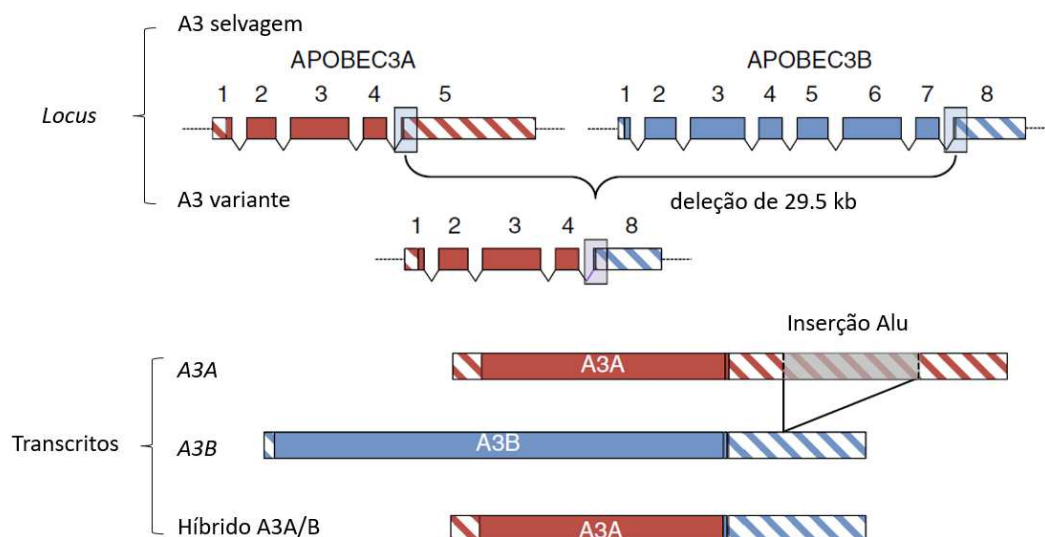
24 Em neoplasias associados ao HPV, o microambiente inflamatório corrobora
25 com altos níveis da expressão de A3A, favorecendo o acúmulo de mutações
26 somáticas condutoras (CHEN et al., 2017; HENDERSON; FENTON, 2015), sugerindo
27 APOBEC como a fonte predominante de mutações em cânceres cervicais (BURK et
28 al., 2017). A3A reforça a carga mutacional somática e corrobora para a instabilidade
29 genômica, promovendo não apenas o início de determinados tumores, mas sua
30 disseminação (HENDERSON; FENTON, 2015).

31 Variações alélicas nos genes A3, como polimorfismos (definidos como
32 variações cujo alelo mais raro está presente em 1% ou mais da população), podem
33 favorecer o aumento da mutagênese, alterar a persistência da infecção pelo HPV e
34 contribuir para a imortalização celular, sendo potenciais marcadores de
35 suscetibilidade e prognóstico de canceres (KARKI et al., 2015; REVATHIDEVI et al.,
36 2021).

1 3.2. POLIMORFISMO APOBEC3A/B (A3A/B)

2 O polimorfismo híbrido de deleção APOBEC3A e APOBEC3B (A3A/B) está
3 sendo frequentemente associado a vários tipos de câncer, com o de câncer de mama
4 (VITIELLO et al., 2019), bexiga, fígado (NIK-ZAINAL et al., 2014b), de cabeça e
5 pescoço, pulmão (GANSMO et al., 2018), colo do útero (REVATHIDEVI et al., 2016)
6 e ovário (GANSMO et al., 2021). O alelo variante na população normal é encontrado
7 com maior incidência na população oceânica (92,9%), asiática (36,9%) e ameríndia
8 (57,7%) do que a europeia (6%) e africana (0,9%), sendo a frequência mundial de
9 22,5% (GANSMO et al., 2021; KIDD et al., 2007; NIK-ZAINAL et al., 2014b).

10 Este polimorfismo é provavelmente originado de uma recombinação homóloga
11 não alélica ancestral no cromossomo 22, que gera a deleção de 29936 pb entre o
12 quinto éxon de A3A e o oitavo éxon de A3B. Os pontos de interrupção da deleção
13 estão dentro de uma sequência com 350 pb de extensão em duas regiões altamente
14 idênticas nas extremidades da exclusão (KLONOWSKA et al., 2017). O produto dessa
15 variação é um gene híbrido A3A/B, que gera um transcrito idêntico ao codificado por
16 A3A selvagem fusionado a região 3' não traduzida (UTR) de A3B (Figura 5). Ou seja,
17 ocorre exclusão de A3B e a proteína resultante do alelo híbrido A3A/B é idêntica a
18 codificada pelo alelo A3A selvagem, mas com regulação pós-transcricional alterada
19 (KIDD et al., 2007; REVATHIDEVI et al., 2021; SADEGHPOUR et al., 2021).



20

21 Figura 5. **Estrutura do polimorfismo de deleção APOBEC3A/B.** Locus de APOBEC3A (A3A) e
22 APOBEC3B (A3B) e da variação alélica após deleção de 29,5 kb abrangendo o quinto éxon de A3A e
23 o oitavo éxon de A3B (destacada pela chave), no cromossomo 22. Transcritos gerados pelos genes

1 selvagens de A3A e A3B e do gene híbrido A3A/B respectivamente. Inserção Alu em A3A também está
2 representada. Adaptado de CAVAL et al., 2014.

3 A expressão gênica dos transcritos selvagens e variantes estão sob controle
4 pós-transcricional através de microRNAs (miRNAs) específicos que interagem com 3'
5 UTR alvo e induzem a repressão ou degradação do mRNA, agindo como silenciadores
6 (REVATHIDEVI et al., 2021).

7 O transcrito híbrido A3A/B é 10 a 20 vezes mais estável e mais expresso que o
8 selvagem (CAVAL et al., 2014). Um estudo que avaliou 30 miRNAs que
9 potencialmente regulam A3A e A3B, por análise *in silico*, concluiu que apenas 8
10 miRNAs específicos para A3B são capazes de regular o transcrito A3A/B
11 (REVATHIDEVI et al., 2016). A perda desses silenciadores é uma consequência direta
12 da deleção causada pelo polimorfismo e resulta em níveis mais elevados de A3A
13 intranuclear (REVATHIDEVI et al., 2021). Vale ressaltar que indivíduos heterozigotos
14 apresentam uma regulação pós-transcricional mais complexa, mas também possuem
15 maior expressão do transcrito A3A/B (CAVAL et al., 2014).

16 Uma das causas mais comuns de carcinogênese é o acúmulo de mutações
17 somáticas (CHEN et al., 2019). O aumento nucleocitoplasmático de A3A leva
18 formação de homodímeros que interagem com o ssDNA genômico celular e se
19 correlacionam com o aumento de mutações assinaturas C>T e C>G em
20 dinucleotídeos TC em células cancerosas (PAN et al., 2021).

21 A desaminação do DNA por A3A pode ocasionar mutações somáticas do tipo
22 *missense*, levando a alteração da sequência do aminoácido a ser codificado (CHEN
23 et al., 2019). Esses aminoácidos são chamados de neoantígenos, porque podem ser
24 apresentados na superfície das células tumorais e reconhecidos como não próprios
25 pelo sistema imunológico (PAN et al., 2021). Logo, A3A poderia aumentar a resposta
26 imunológica contra as células cancerosas e se correlacionar com a resposta a terapia
27 contra o câncer (CHEN et al., 2019).

28 Existem diferentes trabalhos que descrevem a associação da deleção de A3B
29 com o câncer (GANSIMO et al., 2018, 2021; NIK-ZAINAL et al., 2014a; REVATHIDEVI
30 et al., 2016; VITIELLO et al., 2019). Meta-análises que incluíram esses e outros
31 estudos sugerem que a associação de A3A/B com o aumento da suscetibilidade ao
32 câncer em geral é dependente das características étnicas da população analisada e
33 justificado pela alta variabilidade na incidência desse polimorfismo relatado por Kidd

1 et al. (HASHEMI; MOAZENI-ROODI; TAHERI, 2019; KLONOWSKA et al., 2017;
2 REVATHIDEVI et al., 2016).

3 Em relação a infecção pelo HPV, a oncoproteína E7 estabiliza a proteína A3A,
4 codificada pelos alelos A3A e/ou A3A/B, amplificando seu potencial hipermutador do
5 genoma celular (WESTRICH et al., 2018). Além disso, a resposta do sistema imune a
6 infecção viral promove um ambiente rico em interferons que estimulam a transcrição
7 dos genes A3A (MIDDLEBROOKS et al., 2016).

8 Em relação ao câncer cervical, o polimorfismo pode ser protetor pelo aumento
9 da restrição viral e ativação do sistema imunológico, como demonstrado em um
10 estudo *in vitro* onde A3A inibiu a proliferação, migração e invasão de células do câncer
11 cervical (CHEN et al., 2015). Paradoxalmente, a deleção de A3B também pode
12 conduzir a diversidade viral de forma depende do tipo de vírus e do nível de A3A
13 intracelular e acúmulo de mutações somáticas que predispõe alterações neoplásicas
14 cervicais (GANSMO et al., 2021), como detalhado no tópico anterior.

15 Diante do exposto, o polimorfismo A3A/B é uma provável fonte de mutações
16 somáticas que corroboram com a malignização no câncer cervical. A associação do
17 polimorfismo A3A/B com a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões pré-
18 malignas de baixo, alto grau e câncer cervical, não foi analisada na população
19 brasileira em estudos publicados até o presente momento e carece de dados que
20 validem essa conjectura.

21

22

23

24

25

1 **4. OBJETIVOS**

2 4.1. OBJETIVO GERAL

3 Avaliar a associação do polimorfismo APOBEC3A/B com o
4 desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e com o câncer de colo de
5 útero causados pela infecção pelo HPV em mulheres na região Norte do Paraná
6 atendidas pelo serviço público de saúde.
7

8 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 9
- 10 • Detectar o HPV em amostras cervicais (lesões e câncer de colo de útero)
na região Norte do Paraná;
 - 11 • Verificar a associação entre fatores socioepidemiológicos, a infecção pelo
12 HPV e o desenvolvimento de lesões;
 - 13 • Avaliar a frequência do polimorfismo de APOBEC3A/B em mulheres não
14 infectadas e infectadas pelo HPV e de acordo com a presença e grau de
15 lesão e/ou câncer de colo de útero;
 - 16 • Analisar a associação do polimorfismo APOBEC3A/B com a infecção pelo
17 HPV, o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e a incidência do
18 câncer do colo do útero.
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25

1 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 AMADOR-MOLINA, A. et al. Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV)
3 Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. **Viruses**, v. 5, n.
4 11, p. 2624–2642, 28 out. 2013.
- 5 ANDRADE, J. et al. Vulnerabilidade de idosos a infecções sexualmente transmissíveis. **Acta**
6 **Paulista de Enfermagem**, v. 30, n. 1, p. 8–15, jan. 2017.
- 7 ARALDI, R. P. et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview.
8 **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1537–1556, 1 out. 2018.
- 9 ARGYRIS, P. P. et al. Endogenous APOBEC3B overexpression characterizes HPV-positive
10 and HPV-negative oral epithelial dysplasias and head and neck cancers. **Modern Pathology**,
11 v. 34, n. 2, p. 280–290, 2021.
- 12 ASTHANA, S.; BUSA, V.; LABANI, S. Oral contraceptives use and risk of cervical cancer—
13 A systematic review & meta-analysis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology**
14 **and Reproductive Biology**, v. 247, p. 163–175, 1 abr. 2020.
- 15 BAUER, H. M. et al. Genital Human Papillomavirus Infection in Female University Students
16 as Determined by a PCR-Based Method. **JAMA: The Journal of the American Medical**
17 **Association**, v. 265, n. 4, p. 472–477, 1991.
- 18 BERGVALL, M.; MELENDY, T.; ARCHAMBAULT, J. The E1 proteins. **Virology**, v. 445,
19 n. 1–2, p. 35–56, out. 2013.
- 20 BOHN, M.-F. et al. The ssDNA Mutator APOBEC3A Is Regulated by Cooperative
21 Dimerization. **Structure**, v. 23, n. 5, p. 903–911, 5 maio 2015.
- 22 BORDIGNON, V. et al. How Human Papillomavirus Replication and Immune Evasion
23 Strategies Take Advantage of the Host DNA Damage Repair Machinery. **Viruses**, v. 9, n. 12,
24 p. 390, 19 dez. 2017.
- 25 BRAGANHOLI, D. F. et al. 500 years later: Understanding the genetic ancestry of the southeast
26 region, Brazil. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 6, p. e370–
27 e371, 1 dez. 2017.
- 28 BUCK, C. B.; DAY, P. M.; TRUS, B. L. The papillomavirus major capsid protein L1. **Virology**,
29 v. 445, n. 1–2, p. 169–174, out. 2013.
- 30 BURK, R. D. et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer.
31 **Nature**, v. 543, n. 7645, p. 378–384, 23 mar. 2017.
- 32 BURNS, M. B. et al. APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. **Nature**,
33 v. 494, n. 7437, p. 366–370, 21 fev. 2013.

1 BURNS, M. B.; TEMIZ, N. A.; HARRIS, R. S. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in
2 multiple human cancers. **Nature Genetics**, v. 45, n. 9, p. 977–983, 14 set. 2013.

3 CARVALHO, N. S. DE et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis
4 2020: infecção pelo papilomavírus humano (HPV). **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30,
5 n. spe1, 2021.

6 CAVAL, V. et al. A prevalent cancer susceptibility APOBEC3A hybrid allele bearing
7 APOBEC3B 3'UTR enhances chromosomal DNA damage. **Nature Communications**, v. 5, n.
8 1, p. 5129, 9 dez. 2014.

9 CERVANTES-GRACIA, K. et al. APOBECs orchestrate genomic and epigenomic editing
10 across health and disease. **Trends in Genetics**, v. 37, n. 11, p. 1028–1043, 1 nov. 2021.

11 CHAN, K. et al. An APOBEC3A hypermutation signature is distinguishable from the signature
12 of background mutagenesis by APOBEC3B in human cancers. **Nature Genetics**, v. 47, n. 9, p.
13 1067–1072, 10 set. 2015.

14 CHEN, L. et al. APOBEC-mediated genomic alterations link immunity and viral infection
15 during human papillomavirus-driven cervical carcinogenesis. **BioScience Trends**, v. 11, n. 4,
16 p. 383–388, 2017.

17 CHEN, S. et al. APOBEC3A possesses anticancer and antiviral effects by differential inhibition
18 of HPV E6 and E7 expression on cervical cancer. **International journal of clinical and**
19 **experimental medicine**, v. 8, n. 7, p. 10548–57, 2015.

20 CHEN, Z. et al. Integrative genomic analyses of APOBEC-mutational signature, expression
21 and germline deletion of APOBEC3 genes, and immunogenicity in multiple cancer types. **BMC**
22 **Medical Genomics**, v. 12, n. 1, p. 131, 18 dez. 2019.

23 CHERVOVA, A. et al. Analysis of gene expression and mutation data points on contribution
24 of transcription to the mutagenesis by APOBEC enzymes. **NAR Cancer**, v. 3, n. 3, 2 jul. 2021.

25 COSER, J. et al. Cervical human papillomavirus infection and persistence: a clinic-based study
26 in the countryside from South Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n.
27 1, p. 61–68, 1 jan. 2016.

28 CURTI, R. R. DE J. et al. Development of cervical intraepithelial lesions and cervical cancer is
29 not influenced by SOD2 RS4880 polymorphism. **Pathology - Research and Practice**, v. 230,
30 p. 153742, fev. 2022.

31 DE MARTEL, C. et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and
32 HPV type. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 4, p. 664–670, 15 ago. 2017.

1 DE SANJOSÉ, S. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human
2 papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet Infectious**
3 **Diseases**, v. 7, n. 7, p. 453–459, jul. 2007.

4 DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. The natural history of human
5 papillomavirus infection. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.
6 47, p. 2–13, 1 fev. 2018.

7 DELLA FERA, A. N. et al. Persistent Human Papillomavirus Infection. **Viruses**, v. 13, n. 2, p.
8 321, 20 fev. 2021.

9 DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 99–114, out. 2013.

10 DOORBAR, J. et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30,
11 n. SUPPL.5, p. F55–F70, nov. 2012.

12 DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445,
13 n. 1–2, p. 80–98, out. 2013.

14 DOORBAR, J. Host control of human papillomavirus infection and disease. **Best Practice &**
15 **Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 27–41, 1 fev. 2018.

16 DOS SANTOS, M. et al. Genetic Variability of Inflammatory Genes in the Brazilian
17 Population. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 17, n. 11, p. 844–848, 1 nov.
18 2013.

19 FADEN, D. L. et al. APOBEC mutagenesis is tightly linked to the immune landscape and
20 immunotherapy biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 96,
21 p. 140–147, 1 set. 2019.

22 GANSMO, L. B. et al. APOBEC3A/B deletion polymorphism and cancer risk. **Carcinogenesis**,
23 v. 39, n. 2, p. 118–124, 9 fev. 2018.

24 GANSMO, L. B. et al. Impact of the APOBEC3A/B deletion polymorphism on risk of ovarian
25 cancer. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 23463, 6 dez. 2021.

26 GHEIT, T. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology.
27 **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. MAY, 8 maio 2019.

28 GRANADILLO RODRÍGUEZ, M.; FLATH, B.; CHELICO, L. The interesting relationship
29 between APOBEC3 deoxycytidine deaminases and cancer: a long road ahead. **Open Biology**,
30 v. 10, n. 12, p. 200188, 9 dez. 2020.

31 GREEN, A. M.; WEITZMAN, M. D. The spectrum of APOBEC3 activity: From anti-viral
32 agents to anti-cancer opportunities. **DNA Repair**, v. 83, p. 102700, 1 nov. 2019.

1 HASHEMI, M.; MOAZENI-ROODI, A.; TAHERI, M. Association of APOBEC3 deletion with
2 cancer risk: A meta-analysis of 26 225 cases and 37 201 controls. **Asia-Pacific Journal of**
3 **Clinical Oncology**, v. 15, n. 6, p. 275–287, 29 dez. 2019.

4 HENDERSON, S.; FENTON, T. APOBEC3 genes: retroviral restriction factors to cancer
5 drivers. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 5, p. 274–284, 1 maio 2015.

6 HIROSE, Y. et al. High Levels of Within-Host Variations of Human Papillomavirus 16 E1/E2
7 Genes in Invasive Cervical Cancer. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 24 nov. 2020.

8 HONG, S.; LAIMINS, L. A. Manipulation of the innate immune response by human
9 papillomaviruses. **Virus Research**, v. 231, p. 34–40, 2 mar. 2017.

10 INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Brazilian Cervical Cancer Screening Guidelines**. 2. ed.
11 Rio de Janeiro: 2016, 2016.

12 INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil**. INCA
13 ed. Rio de Janeiro: 2019, 2019. v. 148

14 KARKI, R. et al. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics.
15 **BMC Medical Genomics**, v. 8, n. 1, p. 37, 15 dez. 2015.

16 KIDD, J. M. et al. Population Stratification of a Common APOBEC Gene Deletion
17 Polymorphism. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 4, p. e63, 20 abr. 2007.

18 KLONOWSKA, K. et al. The 30 kb deletion in the APOBEC3 cluster decreases APOBEC3A
19 and APOBEC3B expression and creates a transcriptionally active hybrid gene but does not
20 associate with breast cancer in the European population. **Oncotarget**, v. 8, n. 44, p. 76357–
21 76374, 29 set. 2017.

22 LO, C. C.; COSCHIGANO, K. T. ApoB48 as an Efficient Regulator of Intestinal Lipid
23 Transport. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 8 jul. 2020.

24 MARANGON, A. V. et al. The association of the immune response genes to human
25 papillomavirus- related cervical disease in a Brazilian population. **BioMed Research**
26 **International**, v. 2013, 2013.

27 MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 57–79, out.
28 2013.

29 MCBRIDE, A. A. Human papillomaviruses: diversity, infection and host interactions. **Nature**
30 **Reviews Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 95–108, 14 fev. 2022.

31 MCBRIDE, A. A.; WARBURTON, A. **The role of integration in oncogenic progression of**
32 **HPV-associated cancers** **PLoS Pathogens** Public Library of Science, , 1 abr. 2017.

1 MIDDLEBROOKS, C. D. et al. Association of germline variants in the APOBEC3 region with
2 cancer risk and enrichment with APOBEC-signature mutations in tumors. **Nature Genetics**, v.
3 48, n. 11, p. 1330–1338, 19 nov. 2016.

4 NAKAJIMA, K. et al. Apolipoprotein B-48: A Unique Marker of Chylomicron Metabolism.
5 In: **Advances in Clinical Chemistry**. [s.l.] Academic Press Inc., 2014. v. 64p. 117–177.

6 NIK-ZAINAL, S. et al. Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A
7 and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer.
8 **Nature Genetics**, v. 46, n. 5, p. 487–491, 2014a.

9 NIK-ZAINAL, S. et al. Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A
10 and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer.
11 **Nature Genetics**, v. 46, n. 5, p. 487–491, 13 maio 2014b.

12 OKUYAMA, N. C. M. et al. Genetic variant in CXCL12 gene raises susceptibility to HPV
13 infection and squamous intraepithelial lesions development: a case-control study. **Journal of**
14 **Biomedical Science**, v. 25, n. 1, p. 69, 18 dez. 2018.

15 OZBUN, M. A. Extracellular events impacting human papillomavirus infections: Epithelial
16 wounding to cell signaling involved in virus entry. **Papillomavirus Research**, v. 7, p. 188–
17 192, 1 jun. 2019.

18 PAL, A.; KUNDU, R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and
19 Targets for Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 21 jan. 2020.

20 PAN, J. et al. Germline APOBEC3B deletion increases somatic hypermutation in Asian breast
21 cancer that is associated with Her2 subtype, PIK3CA mutations and immune activation.
22 **International Journal of Cancer**, v. 148, n. 10, p. 2489–2501, 15 maio 2021.

23 RAMAKRISHNAN, S.; PARTRICIA, S.; MATHAN, G. Overview of high-risk HPV's 16 and
24 18 infected cervical cancer: Pathogenesis to prevention. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.
25 70, n. C, p. 103–110, mar. 2015.

26 REBHANDL, S. et al. AID/APOBEC deaminases and cancer. **Oncoscience**, v. 2, n. 4, p. 320–
27 333, 28 abr. 2015.

28 REVATHIDEVI, S. et al. Analysis of APOBEC3A/3B germline deletion polymorphism in
29 breast, cervical and oral cancers from South India and its impact on miRNA regulation. **Tumor**
30 **Biology**, v. 37, n. 9, p. 11983–11990, 2016.

31 REVATHIDEVI, S. et al. APOBEC: A molecular driver in cervical cancer pathogenesis.
32 **Cancer Letters**, v. 496, p. 104–116, 1 jan. 2021.

1 RIVA, G. et al. HPV Meets APOBEC: New Players in Head and Neck Cancer. **International**
2 **Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1402, 30 jan. 2021.

3 SADEGHPOUR, S. et al. Human APOBEC3 Variations and Viral Infection. **Viruses**, v. 13, n.
4 7, p. 1366, 14 jul. 2021.

5 SADRI NAHAND, J. et al. Pathogenic role of exosomes and microRNAs in HPV-mediated
6 inflammation and cervical cancer: A review. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 2, p.
7 305–320, 15 jan. 2020.

8 SALTER, J. D.; BENNETT, R. P.; SMITH, H. C. The APOBEC Protein Family: United by
9 Structure, Divergent in Function. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 578–594, 1
10 jul. 2016.

11 SATO, K. et al. APOBEC3D and APOBEC3F Potently Promote HIV-1 Diversification and
12 Evolution in Humanized Mouse Model. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004453, 16 out.
13 2014.

14 SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n.
15 9590, p. 890–907, set. 2007.

16 SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews**
17 **Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 16086, 22 dez. 2016.

18 SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human Papillomavirus Infection and the Multistage
19 Carcinogenesis of Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 22,
20 n. 4, p. 553–560, 2 abr. 2013.

21 SCHWARTZ, S. Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. **Virology**, v.
22 445, n. 1–2, p. 187–196, out. 2013.

23 SHEEHY, A. M. et al. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed
24 by the viral Vif protein. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 646–650, 14 ago. 2002.

25 SMITH, N. J.; FENTON, T. R. The APOBEC3 genes and their role in cancer: insights from
26 human papillomavirus. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 62, n. 4, p. R269–R287, 1
27 maio 2019.

28 SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the
29 role of prevention 2020–2070. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 18, n. 10, p. 663–672, 2
30 out. 2021.

31 SUGAWARA, Y. et al. Cigarette smoking and cervical cancer risk: an evaluation based on a
32 systematic review and meta-analysis among Japanese women. **Japanese Journal of Clinical**
33 **Oncology**, v. 49, n. 1, p. 77–86, 1 jan. 2019.

1 TRUGILO, K. P. et al. Polymorphisms in the TGFB1 signal peptide influence human
2 papillomavirus infection and development of cervical lesions. **Medical Microbiology and**
3 **Immunology**, v. 208, n. 1, p. 49–58, 30 fev. 2019.

4 TSUCHIYA, C. et al. O câncer de colo do útero no Brasil: uma retrospectiva sobre as políticas
5 públicas voltadas à saúde da mulher. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 1, p.
6 137–147, abr. 2017.

7 URIU, K. et al. The Battle between Retroviruses and APOBEC3 Genes: Its Past and Present.
8 **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 124, 17 jan. 2021.

9 VAN DER WAAL, D. et al. Risk prediction of cervical abnormalities: The value of
10 sociodemographic and lifestyle factors in addition to HPV status. **Preventive Medicine**, v. 130,
11 p. 105927, 1 jan. 2020.

12 VANDE POL, S. B.; KLINGELHUTZ, A. J. Papillomavirus E6 oncoproteins. **Virology**, v.
13 445, n. 1–2, p. 115–137, out. 2013.

14 VARTANIAN, J.-P. et al. Evidence for Editing of Human Papillomavirus DNA by APOBEC3
15 in Benign and Precancerous Lesions. **Science**, v. 320, n. 5873, p. 230–233, 11 abr. 2008.

16 VATS, A. et al. Human papillomavirus E6 and E7: What remains? **Tumour Virus Research**,
17 v. 11, p. 200213, 1 jun. 2021.

18 VIEIRA, V. C. et al. Human Papillomavirus E6 Triggers Upregulation of the Antiviral and
19 Cancer Genomic DNA Deaminase APOBEC3B. **mBio**, v. 5, n. 6, 31 dez. 2014.

20 VIEIRA, V. C.; SOARES, M. A. The Role of Cytidine Deaminases on Innate Immune
21 Responses against Human Viral Infections. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–
22 18, 2013.

23 VITIELLO, G. A. F. et al. Transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) promoter
24 region polymorphism in Brazilian breast cancer patients: association with susceptibility,
25 clinicopathological features, and interaction with TGFB1 haplotypes. **Breast Cancer Research**
26 **and Treatment**, v. 178, n. 1, p. 207–219, 2019.

27 VITIELLO, G. A. F. et al. Germline APOBEC3B deletion influences clinicopathological
28 parameters in luminal-A breast cancer: evidences from a southern Brazilian cohort. **Journal of**
29 **Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 146, n. 6, p. 1523–1532, 13 jun. 2020.

30 WALLACE, N. A.; MÜNGER, K. The curious case of APOBEC3 activation by cancer-
31 associated human papillomaviruses. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 1, p. e1006717, 11 jan. 2018.

32 WARREN, C. et al. Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in Human Papillomavirus Infection
33 and Disease Progression. **Viruses**, v. 9, n. 8, p. 233, 21 ago. 2017.

1 WARREN, C. J. et al. APOBEC3A Functions as a Restriction Factor of Human Papillomavirus.
2 **Journal of Virology**, v. 89, n. 1, p. 688–702, jan. 2015a.

3 WARREN, C. J. et al. Role of the host restriction factor APOBEC3 on papillomavirus
4 evolution. **Virus Evolution**, v. 1, n. 1, p. vev015, 1 jan. 2015b.

5 WESTRICH, J. A. et al. Human Papillomavirus 16 E7 Stabilizes APOBEC3A Protein by
6 Inhibiting Cullin 2-Dependent Protein Degradation. **Journal of Virology**, v. 92, n. 7, abr. 2018.

7 WHO. **Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health**
8 **problem and its associated goals and targets for the period 2020 – 2030**. [s.l: s.n.]. v. 2

9 ZHU, B. et al. Mutations in the HPV16 genome induced by APOBEC3 are associated with viral
10 clearance. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 886, 14 dez. 2020.

11
12
13
14
15
16

1 4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

2 3 APOBEC3A/B POLYMORPHISM IS NOT ASSOCIATED TO HPV INFECTION AND 4 CERVICAL CARCINOGENESIS

5 The persistence of infection in the uterine cervix by the Human Papillomavirus of high-
6 risk (HPV-HR) results in different degrees of lesions according to the immunological
7 efficiency of the host. Variations in apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic
8 polypeptide like (APOBEC) genes, such as the APOBEC3A/B deletion hybrid
9 polymorphism (A3A/B), may contribute to cervical malignancy in the presence of HPV.
10 The objective of this study was to evaluate the association of the A3A/B polymorphism
11 with HPV infection and the development of cervical intraepithelial lesions and cervical
12 cancer in Brazilian women. Peripheral blood and cervical secretion samples were used
13 for A3A/B polymorphism genotyping and HPV detection, respectively. The study
14 enrolled 369 women, categorized according to the presence of infection and
15 subdivided by the degree of intraepithelial lesion and cervical cancer, APOBEC3A/B
16 genotyped by allele-specific Polymerase Chain Reaction (PCR). Regarding the A3A/B
17 polymorphism, the distribution of the genotypes was equivalent between the groups
18 and among analyzed subgroups. There were no significant differences in the presence
19 of infection or development of lesions, even after excluding confounding factors. This
20 is the first study that demonstrates the non-association of the A3A/B polymorphism
21 with HPV infection and the development of intraepithelial lesions and cervical cancer
22 in Brazilian women, being essential for the social and genetic characterization of these
23 women.

24
25 **Keywords:** Human papillomavirus. Cervical intraepithelial lesions. Deaminases
26 APOBEC. Mutation Accumulation.

27 28 29 1. INTRODUCTION

30 Human papillomavirus (HPV) infection of the cervix results in different outcomes
31 depending on the viral type involved, persistence of infection, and the host's intrinsic
32 immune characteristics (DOORBAR, 2018). Asymptomatic infections or infections that
33 generate benign lesions are more frequent than malignant lesions that are precursors
34 of cervical cancer (DELLA FERA et al., 2021). However, this virus is a necessary cause
35 of cervical cancer (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

36 Variations in the apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide
37 like 3 (APOBEC3) gene, such as the APOBEC3A and APOBEC3B deletion hybrid
38 (A3A/B), may be associated with persistent viral infections and establishment of
39 somatic mutations that predispose cellular malignancies (REVATHIDEVI et al., 2021).

40 The variant A3A/B allele is characterized by the deletion of 29936 base pairs
41 (bp) between the fifth exon of A3A and the eighth exon of A3B (KLONOWSKA et al.,

1 2017). Results in a hybrid gene encoding a wild-type A3A-identical transcript fused to
2 the 3' untranslated region (UTR) of A3B (KIDD et al., 2007; SADEGHPOUR et al.,
3 2021). Consequently, A3B protein exclusion occurs and the post-transcriptional
4 regulation of A3A is reduced, amplifying the nucleocytoplasmic levels of the protein
5 (REVATHIDEVI et al., 2021). The A3A/B hybrid transcript is 10 to 20 times more stable
6 and more expressed than the wild type (CAVAL et al., 2014).

7 The increased expression of the A3A protein, encoded by the wild-type allele
8 and/or by the variant allele, favors the formation of homodimers that tend to interact
9 with specific sites (5'TC) in RNA or single-stranded DNA (ssDNA) (GREEN;
10 WEITZMAN, 2019; PAN et al., 2021). The main consequence is the deamination of
11 cytidines (C) to uridines (U) (WARREN et al., 2017), which in the absence or failure of
12 DNA repair generates double-strand breaks (DSB) or somatic mutations by
13 transversions (C>G) or transitions (C>T) (HENDERSON; FENTON, 2015). These
14 signature A3A mutations are found in bladder (NIK-ZAINAL et al., 2014b), cervical
15 (CHEN et al., 2015; REVATHIDEVI et al., 2021), breast (BURNS et al., 2013;
16 REVATHIDEVI et al., 2016), ovarian (GANSMO et al., 2021), head/neck (ARGYRIS et
17 al., 2021), and lung (GANSMO et al., 2018) cancers.

18 In cervical cancer, the increase in A3A and A3B deletion reinforces the somatic
19 mutational load established by the virus, corroborates the genomic instability of
20 cervical cells and increases viral diversity, predisposing cervical neoplastic alterations
21 (GANSMO et al., 2018; HENDERSON; FENTON, 2015).

22 Considering that HPV infection has a worldwide incidence (WHO, 2020) and
23 that cervical cancer is the third most common in Brazilian women (INCA; MINISTÉRIO
24 DA SAÚDE, 2019), the study of possible sources of somatic mutations, such as the
25 A3A/B polymorphism, is essential for understanding the mechanisms of malignancy of
26 cervical cell lesions.

27 Given the above, the objective of this study was to evaluate the association of
28 the A3A/B polymorphism with HPV infection, the development of cervical intraepithelial
29 lesions and cervical cancer.

30 31 **2. MATERIALS AND METHODS**

32 **2.1. ETHICAL APPROVAL AND SAMPLE CHARACTERIZATION**

1 The present study was approved by Institutional Ethics Committee Involving
2 Humans at State University of Londrina, Londrina – Paraná (PR), Brazil (CEP/UEL
3 133/2012; CAAE 05505912.0.0000.5231). The study purpose and procedures were
4 explained to all patients and written informed consent was obtained. The women
5 enrolled in this case control-study were recruited in public health services in Londrina-
6 PR, Brazil. Samples were obtained from a biobank of 700 women, which was
7 constructed by non-probabilistic collection (obtained by convenience, non-randomly).
8 The selection criterion was amplification for the variant A3A/B allele. After sample
9 collection, cytobrushes containing cervical cells were stored in 2 mL TE buffer (10 mM
10 Tris-HCL, 1 mM EDTA pH 8.0) at -20°C until DNA extraction. Peripheral blood was
11 collected with EDTA as anticoagulant and stored at 7°C for a brief period before
12 extraction. Structured questionnaire was applied concerning sociodemographic,
13 reproductive and sexual behavioral data. Participants were stratified based on HPV
14 DNA presence or absence. Cervical cytology results were collected from medical
15 records.

16 Genomic DNA was obtained from cervical cytobrushes using DNAzol
17 (Invitrogen™ Inc., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions,
18 and from peripheral blood using Biopur Mini Spin Plus Kit (Biometrix®, Curitiba, PR,
19 Brazil). DNA concentration was measured at 260nm on a NanoDrop 2000c™
20 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and purity was
21 assessed by absorbance ratio measured at 260 nm and 280 nm.

22

23 **2.2. HPV DETECTION**

24 HPV was detected by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the primers
25 MY09 (5'-CGTCCMAARGGAWACTGATC-3') and MY11
26 (5'- GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'), which are designed to amplify a conserved
27 region of approximately 450 bp in the HPV L1 gene (BAUER et al., 1991). Reaction
28 conditions were 190 nM of dNTPs, 500 nM of each primer, 2 mM of MgCl₂, 1X of Buffer
29 (200 mM Tris-HCL, 500 mM KCl), approximately 80 ng of DNA and 1.25 U of Taq
30 polymerase (Invitrogen™), with an annealing temperature of 55°C. β-globin gene
31 amplification (268 bp) was performed as an internal control, using primers GH20 (5'-
32 GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') and PC04 (5'- CAACTTCATCCACGTTCCACC-3')
33 (MARANGON et al., 2013) under the same conditions of HPV PCR. Reactions without

1 DNA template were used as negative control to test for contamination, and DNA from
2 HeLa cells, which are stably integrated with HPV18, was used as positive control. PCR
3 products were electrophoresed on 10% polyacrylamide gel and stained with aqueous
4 solution of silver nitrate 0.15%.

5 **2.3. APOBEC3A/B POLYMORPHISM GENOTYPING**

6 The distinction between alleles for the APOBEC3A/B polymorphism was
7 performed by the allele-specific PCR technique (KIDD et al., 2007) using specific
8 primers for the variant allele (del) (forward: 5'-TAGGTGCCACCCCGAT-3' e reverse
9 5'-TTGAGCATAATCTTACTCTTGTAC-3') and for the wild allele (ins) (insertion1:
10 forward 5'- TTGGTGCTGCCCCCTC-3' e reverse 5'-TAGAGACTGAGGCCCAT-3';
11 insertion2: forward 5'-TGTCCTTTTCAGAGTTTGAGTA-3' e reverse 5'-
12 TGGAGCCAATTAATCACTTCAT-3'). Primers for the variant allele sequence generate
13 a 700 bp PCR product after variant allele-specific amplification with the deletion.
14 Primers for the wild allele Insertion1 and Insertion2 amplify only the insertion
15 configuration and produce 490 and 705bp products, respectively.

16 PCR assays for variant and wild alleles were performed separately, were 0.1
17 mM of dNTPs, 0.25 µM of each primer, 1 mM of MgCl₂, 1X of Buffer, approximately 50
18 ng of DNA and 1U of Taq polymerase (Invitrogen™), and the PCR temperature cycles
19 for amplification of the A3A/B fragment were 5 minutes of denaturation at 95°C, 40
20 cycles of 30 seconds involving denaturation and hybridization at 95°C and 61°C and
21 45 seconds for extension at 72°C respectively. In addition, each of the samples, which
22 appeared to be homozygous for the variant allele, were genotyped using a second set
23 of oligonucleotides for the wild allele (Insertion2).

24

25 **2.4. STATISTICAL ANALYSIS**

26 The study population was divided into two groups according to the status of HPV
27 infection: uninfected (control) and infected. The infected patients were stratified into
28 without cervical lesion, with low-grade intraepithelial lesion (LSIL), high-grade
29 intraepithelial lesion (HSIL) and cervical cancer according to the result of the
30 cytological examination.

31 The association of socio-epidemiological variables with the groups of infection
32 or with those of injury was assessed by Chi-square test or Fisher Exact test when

1 appropriated. Logistic regression was used for adjusted prediction of the studied
2 polymorphism influence on infection and injuries development.

3 The significance level of $P < 0.05$ was adopted. The tests were performed using
4 SPSS Statistics 22.0 software (SPSS Inc., Chicago).

6 **3. RESULTS**

7 **3.1. Characteristics of the study population**

8 The study population consisted of 369 women, of whom 207 (61.1%) positive,
9 and 162 (38.9%) negative for HPV DNA. Infected women were divided in groups
10 without lesions ($n=74$), Low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) ($n= 14$),
11 High-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) ($n= 45$) and cervical cancer ($n=69$).

12 Sociodemographic, sexual behavior and reproductive data are listed in Table 1
13 and Table 2, respectively. HPV infection was frequently seen in women aged ≤ 24 e
14 ≥ 55 years ($p=0.003$), smokers ($p=0.009$), with monthly income ≤ 1 minimum wage
15 ($p=0.028$), who used contraceptives ($p=0.001$) and preservatives ($p=0.010$), also
16 patients who had their first sexual intercourse with 17 years or younger ($p =0.030$).

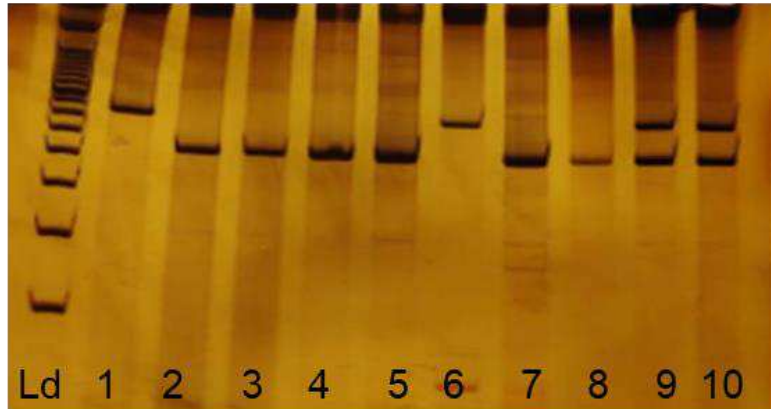
17 **3.2. Association between squamous intraepithelial lesions and socio-** 18 **demographic, sexual behavioral and reproductive data**

19 When associating the degree of squamous intraepithelial lesion with
20 sociodemographic characteristics, a significant association was observed for age (≥ 55
21 years $p < 0.001$), smoking (ex-smokers $p=0.032$), educational status (incomplete
22 elementary $p=0.019$) and monthly income ($p=0.013$), shown in Table 3. While the
23 association between Squamous Intraepithelial Lesions and sexual behavioral and
24 reproductive features was observed in patients who used contraceptives ($p < 0.001$)
25 and not using preservatives ($p=0.032$), Table 4.

27 **3.3. APOBEC3A/B polymorphism distribution between HPV infection, LSIL,** 28 **HSIL and Cervical Cancer**

29 The patients were classified into three groups according to the genotype for the
30 polymorphism, in homozygous for wild-type allele (ins/ins), heterozygous (ins/del) and
31 homozygous for variant allele (del/del), when the polymorphism was present in both

1 alleles, with the electrophoretic profile shown in Figure 1. Of the total of 369 women
2 selected for the study, 242 (65.6%) were wild-type homozygous, 103 (27.9%) were
3 heterozygous and 24 (6.5%) were variant homozygous.



4
5 **Figure 1: Electrophoretic profile of APOBEC3A/B polymorphisms.** Ld: 100 bp molecular standard;
6 2,3,4,5,7 and 8 homozygous for wild-type allele (490bp); 9 and 10 heterozygous (490bp and 700bp), 1
7 and 6 homozygous for variant allele (700bp).

8 According to data in Table 5, it was observed that in the group of HPV-
9 uninfected patients the wild-type homozygous genotype was present in 103 women
10 (63.8%), heterozygous in 51 women (31.4%) and variant homozygous in 8 women
11 (4.8%). In the HPV-infected group 139 (67.1%) women were homozygous for wild-type
12 allele, 52 (25.2%) heterozygous and 16 (7.7%) homozygous for variant genotypes. No
13 significant difference was observed between HPV-uninfected and HPV-infected group
14 ($p=0.275$), moreover when multinomial logistic regression adjusted for age, smoking
15 status, monthly income, contraceptive, preservative, age at sexarche and sexual
16 partners, there was also no significant association.

17 Analyzing the group of patients infected by HPV by the degree of intraepithelial
18 lesion, by the categorization No Lesion, LSIL, HSIL and Cancer, no significant
19 association was observed ($p=0.361$) with polymorphism (Table 6). No significant
20 association was observed between lesions, cervical cancer and A3A/B polymorphism
21 when analyzed using multinomial logistic regression, not even after adjusting for
22 confounding factors (contraceptive, preservative, age, smoking status and monthly
23 income) (Table 7).

24

25 **4. DISCUSSION**

26 In this study, for the first time in Brazil, we performed the genotyping of the
27 A3A/B polymorphism and we associate the influence of this genetic variation with on

1 HPV infection and development of intraepithelial lesions and cervical cancer. We also
2 corroborate the description of sociodemographic, sexual behavior and reproductive
3 aspects that are related to the greater probability of persistent HPV infection and the
4 development of low (LSIL) and high (HSIL) grade squamous intraepithelial lesions and
5 cervical cancer in this same population.

6 In the infected group, a higher frequency of patients without lesions or with LSIL
7 was expected than with HSIL or cervical cancer, if we consider the probability of
8 progression of HPV lesions (DELLA FERA et al., 2021). However, in our work, the
9 proportion of women with HSIL and cervical cancer was higher than that of LSIL,
10 possibly because the samples were obtained from public health services. Brazilian
11 epidemiological data show that 70% of the diagnoses of women treated by the public
12 health service occur in the advanced stage of the disease, resulting in a worse
13 prognosis (TSUCHIYA et al., 2017), corroborating the frequency found here.

14 The characteristics that were significantly associated with a higher frequency of
15 HPV infection and the development of intraepithelial lesions in the studied group were
16 age, smoking, monthly income, contraceptive use, preservative use, age of first sexual
17 intercourse and educational stage.

18 Age is a characteristic of susceptibility to HPV infection and the development of
19 lesions that is well established in previous studies and women under 24 years or over
20 55 years are more affected by the infection, as demonstrated in this study (COSER et
21 al., 2016; CURTI et al., 2022; DE SANJOSÉ et al., 2007; OKUYAMA et al., 2018;
22 RAMAKRISHNAN; PARTRICIA; MATHAN, 2015). Younger women have a more
23 intense sexual activity that favors the transmission of HPV oncogenic types (COSER
24 et al., 2016). The early onset of sexual activity, sexarche, also favors infection by
25 increased exposure of the immature epithelium to the virus (VAN DER WAAL et al.,
26 2020). At the other end of this variable are women 55 years of age and older who
27 become vulnerable to HPV infection due to increased sexual activity due to prolonged
28 life expectancy and quality of life (ANDRADE et al., 2017) and possibly by the
29 reactivation of latent viruses due to hormonal changes occurring in climacteric (DE
30 SANJOSÉ et al., 2007). The persistence of HPV infection, the immune response
31 limited by aging or pre-existing syndromes/diseases, and the accumulation of
32 mutations from cellular senescence justify, in part, the increase in intraepithelial lesions

1 and cervical cancer in a manner proportional to age (DOORBAR, 2018; MCBRIDE,
2 2022; SCHIFFMAN et al., 2016).

3 Here, we demonstrated that smoking is related to cancer development and HPV
4 infection, corroborating previous studies by our group (CURTI et al., 2022; OKUYAMA
5 et al., 2018; TRUGILO et al., 2019). This association occurs because of DNA damage,
6 immunosuppression and epithelial dysplasia caused by cigarette components directly
7 affect tumor development (SUGAWARA et al., 2019).

8 Regarding contraceptive use, we found a significant association with HPV
9 infection and the development of cervical cancer, which possibly occurs because of
10 endometrial hyperplasia generated by hormonal imbalance, as reviewed in a recent
11 meta-analysis (ASTHANA; BUSA; LABANI, 2020).

12 Preservative use decreases transmission and favors viral elimination
13 (CARVALHO et al., 2021). We hypothesize that the association of infection with
14 preservative use is by the environment where these patients are inserted, that is,
15 possibly because these women are being seen in a Basic Health Unit and have already
16 received guidance for use. However, agreeing with the expected 80.8% of individuals
17 with HPV did not use preservatives, of these 80.1% developed significantly more
18 severe injuries.

19 The relationship between ethnicity and susceptibility to HPV infection is
20 complex, even more so because the data were obtained based on patients' self-
21 disclosure. The Brazilian population is highly mixed race and possesses a
22 heterogeneous ancestry that encompasses native indigenous and immigrants from
23 Europe, Africa and Asia (DOS SANTOS et al., 2013). In addition, race in Brazilian
24 society is a determining factor for socioeconomic and cultural ascension, access to
25 education and health services. That said, we grouped individuals into Caucasians and
26 not-Caucasians seeking a non-biased view of the data, but one that contemplated the
27 social differences between these groups. Considering that Brazil is a continental
28 country and that the distribution of this heritage varies according to the region, it is
29 prudent to point out that the study group is from the same region and represents a
30 sample from the southern region that is mostly colonized by the European population
31 (BRAGANHOLI et al., 2017).

1 We investigated for the first time in the Brazilian population the association of
2 the A3A/B polymorphism with HPV infection, with the presence of LSIL, HSIL and with
3 susceptibility to cervical cancer.

4 Overexpression of variations in APOBEC3 genes is reported as a possible
5 source of aberrant DNA editing during replication, repair or transcription, being able to
6 induce somatic mutations causing genomic instability in cancer cells (CHERVOVA et
7 al., 2021). Data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) show the presence of
8 signature mutations (C to T transitions or C to G transversions, in TCX sequences
9 where the underlined base is the mutated base and X can be any base) (GRANADILLO
10 RODRÍGUEZ; FLATH; CHELICO, 2020) attributed to APOBEC3A (A3A) activity and
11 APOBEC3B (A3B) in breast, bladder, lung, head and neck, and cervical cancers
12 (MIDDLEBROOKS et al., 2016; REVATHIDEVI et al., 2021).

13 The A3A/B polymorphism confers greater susceptibility to cancer, as it
14 generates a hybrid transcript between A3A and A3B 3'UTR that is more stable and
15 more expressed in cells (GANSMO et al., 2021). A3A signature mutations are more
16 prevalent in cancer cells (SALTER; BENNETT; SMITH, 2016), and the A3A protein is
17 capable of hypermutating nuclear DNA and generating double-stranded DNA breaks
18 (DSBs), apoptosis and promoting mutations in cancer-driver genes, which contributes
19 to tumorigenesis (CAVAL et al., 2014).

20 In cervical cancer, there is a microenvironment that favors the mutagenic activity
21 of A3A: 1. accumulation of A3A stimulated by the production of interferons in response
22 to viral infection (MIDDLEBROOKS et al., 2016); 2. Direct action of HPV-HR
23 oncoprotein E7 inhibits proteasomal degradation of A3A making it more stable
24 (WESTRICH et al., 2018); 3. Replicative stress promoted by HPV-HR increases
25 cellular ssDNA exposure making it susceptible to A3 restriction (RIVA et al., 2021).

26 In our study, we did not find an association of the A3A/B polymorphism with
27 infection, LSIL, HSIL or with cervical cancer, which corroborates with previous studies
28 that did not demonstrate this association in other sample groups (REVATHIDEVI et al.,
29 2016), but contrasts with another study that shows this association (CHEN et al., 2017).

30 Polymorphisms has a frequency dependent on the ancestry of the sample
31 group, with frequency of A3A/B in Asian (37%), Amerindian (57.7%), European (6%)
32 and African (0.9%) (GANSMO et al., 2021; KIDD et al., 2007; NIK-ZAINAL et al.,
33 2014b). Here, as already mentioned, the study group was composed mostly of self-

1 declared Caucasian women of probably European descent, so the prevalence of this
2 genetic variation is statistically lower. The non-association found reflects the southern
3 region of Brazil.

4 In addition, there is no consensus in the literature on the role of A3A and A3B
5 in the development of lesions and cervical cancer (SMITH; FENTON, 2019),
6 highlighting the need for studies such as ours to investigate this association. A3B is
7 reported as the main protein responsible for mutagenesis during cancer, which could
8 explain the non-association of the polymorphism (absent translated A3B region) with
9 carcinogenesis (BURNS et al., 2013). While in other studies A3A is reported as a
10 source for somatic mutations in the host genome and corroborates significant
11 associations of the polymorphism with cervical lesions (CHAN et al., 2015; WARREN
12 et al., 2017). This inconsistency in the definition of the A3 mechanism in cervical cancer
13 makes it difficult to interpret the polymorphism role in this situation.

14 In this study, we reviewed the main sociodemographic and sexual and
15 reproductive behavior characteristics associated with HPV infection and the
16 development of precursor lesions and cervical cancer. We demonstrate that the
17 APOBEC3A/B polymorphism does not contribute to HPV infection, neither to the
18 development of low or high grade cervical intraepithelial lesions and cervical cancer in
19 a southern Brazilian population.

20

1 **Table 1.** Sociodemographic characteristics of HPV positive patients and controls.

VARIABLES	HPV -		HPV +		p value*	
	N	%	N	%		
Age (years)	≤ 24	10	6.2	26*	12.6	0.003
	25 – 34	41	25.3	46	22.2	
	35 – 44	39	24.1	48	23.2	
	45 – 54	47	29.0	33	15.9	
	≥ 55	25	15.4	54*	26.1	
Ethnicity	Caucasian	80	50.3	102	50.0	0.953
	Not Caucasian	79	49.7	102	50.0	
Smoking status	No	123	76.4	130	62.8	0.009
	Yes	22	13.7	54*	26.1	
	Ex-smoker	16	9.9	23	11.1	
Educational stage^b	Incomplete elementary	48	30.2	85*	41.7	0.082
	Complete elementary	18	11.3	27	13.2	
	Incomplete secondary	19	12.0	23	11.3	
	Complete secondary	56	35.2	57	28.0	
	Incomplete higher education	5	3.1	6	2.9	
	Complete higher education	13	8.2	6	2.9	
Marital status	Married	118	72.8	135	65.5	0.067
	Single	14	8.6	37*	18.0	
	Divorced	22	13.6	22	10.7	
	Widowed	8	5.0	12	5.8	
Monthly income^a	≤ 1 minimum wage	70	44.3	75	54.3*	0.028
	>1 - 3 min. wages	80	50.6	54	39.1	
	>3 - 5 min. wages	4	2.5	9	6.6	
	>5 - 7 min. wages	3	2.0	0	0.0	
	≥ 7 min. wages	1	0.6	0	0.0	

2 ^aBased on Brazilian minimum wage (approximately U\$ 215.00). ^bBased on Brazilian educational system. *Analysis by two-sided
3 Chi-square (χ^2) test or Fisher test, when appropriated, and $p < 0.05$ set as significance level (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).
4 Some categories did not complete the total of patients due to lack of data. Bold values represent statistical significance ($p < 0.05$).

1 **Table 2.** Sexual behavioral and reproductive features of HPV positive patients and
 2 controls.

VARIABLES		HPV -		HPV +		p value*
		N	%	N	%	
Contraceptive	No	115	71.9	114	55.3	0.001
	Yes	45	28.1	92*	44.7	
Preservative	No	143	90.5	164	80.8	0.010
	Yes	15	9.5	39*	19.2	
Age at menarche (years)	≤11	38	23.6	32	23.0	0.509
	12	35	21.7	40	28.8	
	13	36	22.4	30	21.6	
	≥14	2	32.3	37	26.6	
Age at sexarche (years)	≤17	80	49.4	86*	61.9	0.030
	≥18	82	50.6	53	38.1	
Sexual partners during the lifetime	1	64	40.0	36	26.0	0.072
	2	27	16.9	20	14.5	
	3	21	13.0	23	16.7	
	4	14	8.8	16	11.6	
	≥5	34	21.3	43	31.2	
Knowledge about HPV	No	28	17.5	37	26.6	0.102
	Have ever heard	88	55.0	74	53.2	
	Yes	44	27.5	28	20.2	
Knowledge about the transmission of HPV	No	69	43.1	63	45.7	0.661
	Yes	91	56.9	75	54.3	

3 *Analysis by two-sided Chi-square (χ^2) test and $p < 0.05$ set as significance level (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Some
 4 categories did not complete the total of patients due to lack of data. Bold values represent statistical significance ($p < 0.05$).
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11

1 **Table 3.** Association between Squamous Intraepithelial Lesions and sociodemographic characteristics.

VARIABLES	No Lesions		LSIL		HSIL		CANCER		p value*	
	N	%	N	%	N	%	N	%		
Age (years)	≤ 24	13	17.6	4	28.6	7	15.6	0	0.0	<0.001
	25 – 34	22	29.7	4	28.6	15	33.3	5	7.2	
	35 – 44	17	23.0	2	14.3	11	24.4	17	24.6	
	45 – 54	9	12.1	2	14.3	7	15.6	15	21.7	
	≥ 55	13	17.6	2	14.2	5	11.1	32*	46.5	
Ethnicity	Caucasian	37	50.0	5	38.5	21	48.8	36	52.2	0.840
	Not Caucasian	37	50.0	8	61.5	22	51.2	33	47.8	
Smoking status	No	54	73.0	7	50.0	26	57.8	39	56.6	0.032
	Yes	16	21.6	6	42.9	16	35.6	15	21.7	
	Ex-smoker	4	5.4	1	7.1	3	6.6	15*	21.7	
Educational Stage^b	Incomplete elementary ^h	20	27.0	5	35.7	18	41.9	40*	58.8	0.019
	Complete elementary	9	12.2	1	7.1	5	11.6	11	16.2	
	Incomplete secondary	10	13.5	2	14.3	7	16.3	4	5.9	
	Complete secondary	30	40.5	6	42.9	9	20.9	10	14.7	
	Incomplete higher education	3	4.1	0	0.0	3	7.0	0	0.0	
	Complete higher education	2	2.7	0	0.0	1	2.3	3	4.4	
Marital status	Married	48	64.9	9	64.3	31	68.9	43	63.3	0.661
	Single	17	23.0	2	14.3	9	20.0	9	13.2	
	Divorced	5	6.8	2	14.3	5	11.1	9	13.2	
	Widowed	4	5.3	1	7.1	0	0.0	7	10.3	
Monthly income^a	≤ 1 minimum wage	31	41.9	8	57.1	30*	71.4	3	100.0	0.013
	>1 - 3 minimum wages	34	45.9	6	42.9	12	28.6	0	0.0	
	>3 - 5 minimum wages	9	12.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	
	>5 - 7 minimum wages	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	
	≥ 7 minimum wages	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	

2 ^aBased on Brazilian minimum wage (approximately US\$ 215.00). ^bBased on Brazilian educational system. *Analysis by two-sided Chi-square (X^2) test or Fisher test, when necessary, and $p < 0.05$ set as significance level
3 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesions); HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesions); Some categories did not complete the total of patients due to lack of data. Bold
4 values represent statistical significance ($p < 0.05$).
5

1
2
3
4
5

Table 4. Association between Squamous Intraepithelial Lesions and sexual behavioral and reproductive features.

VARIABLES		No Lesions		LSIL		HSIL		CANCER		p value*
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Contraceptive	No	53	71.6	6	42.9	27	60.0	25	36.8	<0.001
	Yes	21	28.4	8	57.1	18	40.0	43*	63.2	
Preservative	No	64	86.5	11	78.6	37	88.1*	47	69.1	0.032
	Yes	10	13.5	3	21.4	5	11.9	21	30.9	
Age at menarche (years)	≤11	13	17.6	4	28.6	14	31.8	0	0.0	0.388
	12	25	33.8	2	14.2	11	25.0	2	66.7	
	13	14	18.9	4	28.6	11	25.0	0	0.0	
	≥14	22	29.7	4	28.6	8	18.2	1	33.3	
Age at sexarche (years)	≤17	41	55.4	10	71.4	31	70.5	3	100.0	0.167
	≥18	33	44.6	4	28.6	13	29.5	0	0.0	
Sexual partners during the lifetime	1	26	35.6	3	21.4	5	11.6	0	0.0	0.062
	2	10	13.7	3	21.4	4	9.3	0	0.0	
	3	10	13.7	4	28.6	9	20.9	0	0.0	
	4	6	8.2	3	21.4	6	14.0	1	33.3	
	≥5	21	28.8	1	7.2	19	44.2	2	66.7	
Knowledge about HPV	No	20	27.0	2	14.3	13	30.2	1	33.3	0.823
	Have ever heard	38	51.4	10	71.4	21	48.8	1	33.3	
	Yes	16	21.6	2	14.3	9	21.0	1	33.4	
Knowledge about the transmission of HPV	No	27	37.0	7	50.0	22	51.2	2	66.7	0.365
	Yes	46	63.0	7	50.0	21	48.8	1	33.3	

*Analysis by two-sided Chi-square (X^2) test or Fisher test, when appropriated, and $p < 0.05$ set as significance level (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesions); HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesions); Some categories did not complete the total of patients due to lack of data. Bold values represent statistical significance ($p < 0.05$).

1 **Table 5.** Association between the polymorphism APOBEC3A/B and HPV infection by multinomial logistic regression.

		HPV -	HPV +	<i>p</i> value*	OR	CI	<i>p</i> value	OR ^{adj}	CI ^{adj}	<i>p</i> value ^{**adj}
		N (%)	N (%)							
Genotypic	ins/Ins	103 (63.8)	139 (67.1)		1	1	1	1	1	1
	ins/del	51 (31.4)	52 (25.2)	0.275	0.756	0.476-1.200	0.235	0.556	0.308-1.001	0.050
	del/del	8 (4.8)	16 (7.7)		1.482	0.611-3.595	0.384	1.647	0.539-5.036	0.382

2 *Analysis by two-sided Chi-square (X^2) test and $p < 0.05$ set as significance level. OR (odds ratio) and CI (confidence interval) 95% estimated by multinomial logistic regression with "ins/ins" as reference and ^{**adj}adjusted
 3 by age, smoking status, monthly income, contraceptive, preservative, age at sexarche and sexual partners (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).
 4

6 **Table 6.** Association between the polymorphism APOBEC3A/B, HPV infection and Squamous Intraepithelial Lesions.

VARIABLES	HPV +				<i>p</i> value*	
	No Lesions	LSIL	HSIL	CANCER		
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)		
Genotypic	ins/Ins	47 (63.5)	12 (85.8)	29 (64.4)	49 (71)	0.361
	ins/del	19 (25.7)	1 (7.1)	12 (26.7)	18 (26.1)	
	del/del	8 (10.8)	1 (7.1)	4 (8.9)	2 (2.9)	

7 *Analysis by two-sided Fisher Exact test and $p < 0.05$ set as significance level (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesions); HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesions);
 8 Some categories did not complete the total of patients due to lack of data. Bold values represent statistical significance ($p < 0.05$).
 9

1 **Table 7.** Association between the polymorphism APOBEC3A/B and Squamous Intraepithelial Lesions by multinomial logistic regression.

	LSIL			HSIL			CANCER			
	OR	CI	<i>p</i> value*	OR	CI	<i>p</i> value*	OR	CI	<i>p</i> value*	
	ins/Ins	1	1	ref	1	1	1	1	1	1
Genotypic	ins/del	0.206	0.025-1.698	0.142	1.024	0.434-2.415	0.958	0.909	0.425-1.941	0.805
	del/del	0.490	0.056-4.302	0.520	0.810	0.224-2.933	0.749	0.240	0.048-1.188	0.080
		OR^{adj}	CI^{adj}	<i>p</i> value** ^{adj}	OR^{adj}	CI^{adj}	<i>p</i> value** ^{adj}	OR^{adj}	CI^{adj}	<i>p</i> value** ^{adj}
	ins/Ins	1	1	ref	1	1	1	1	1	1
Genotypic	ins/del	0.214	0.024-1.891	0.166	1.112	0.426-2.902	0.828	4.871 ⁻⁹	-	0.998
	del/del	0.489	0.047-5.127	0.551	0.559	0.100-3.141	0.509	2.230	0.085-58.29	0.630

2 *OR (odds ratio) and CI (confidence interval) 95% estimated by multinomial logistic regression with "ins/ins" as reference and **^{adj}adjusted by contraceptive, preservative, age, smoking status and monthly income (SPSS
3 Inc., Chicago, Illinois, USA). LSIL (Low-grade squamous intraepithelial lesions); HSIL (High-grade squamous intraepithelial lesions). Statistical significance (*p*<0.05).

1 REFERENCES OF THE ARTICLE

2

3 ANDRADE, J. et al. Vulnerabilidade de idosos a infecções sexualmente transmissíveis. **Acta**
4 **Paulista de Enfermagem**, v. 30, n. 1, p. 8–15, jan. 2017.

5 ARGYRIS, P. P. et al. Endogenous APOBEC3B overexpression characterizes HPV-positive
6 and HPV-negative oral epithelial dysplasias and head and neck cancers. **Modern Pathology**,
7 v. 34, n. 2, p. 280–290, 2021.

8 ASTHANA, S.; BUSA, V.; LABANI, S. Oral contraceptives use and risk of cervical cancer—
9 A systematic review & meta-analysis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology**
10 **and Reproductive Biology**, v. 247, p. 163–175, 1 abr. 2020.

11 BAUER, H. M. et al. Genital Human Papillomavirus Infection in Female University Students
12 as Determined by a PCR-Based Method. **JAMA: The Journal of the American Medical**
13 **Association**, v. 265, n. 4, p. 472–477, 1991.

14 BRAGANHOLI, D. F. et al. 500 years later: Understanding the genetic ancestry of the southeast
15 region, brazil. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 6, p. e370–
16 e371, 1 dez. 2017.

17 BURNS, M. B. et al. APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. **Nature**,
18 v. 494, n. 7437, p. 366–370, 21 fev. 2013.

19 CARVALHO, N. S. DE et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis
20 2020: infecção pelo papilomavírus humano (HPV). **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30,
21 n. spe1, 2021.

22 CAVAL, V. et al. A prevalent cancer susceptibility APOBEC3A hybrid allele bearing
23 APOBEC3B 3'UTR enhances chromosomal DNA damage. **Nature Communications**, v. 5, n.
24 1, p. 5129, 9 dez. 2014.

25 CHAN, K. et al. An APOBEC3A hypermutation signature is distinguishable from the signature
26 of background mutagenesis by APOBEC3B in human cancers. **Nature Genetics**, v. 47, n. 9, p.
27 1067–1072, 10 set. 2015.

28 CHEN, L. et al. APOBEC-mediated genomic alterations link immunity and viral infection
29 during human papillomavirus-driven cervical carcinogenesis. **BioScience Trends**, v. 11, n. 4,
30 p. 383–388, 2017.

31 CHEN, S. et al. APOBEC3A possesses anticancer and antiviral effects by differential inhibition
32 of HPV E6 and E7 expression on cervical cancer. **International journal of clinical and**
33 **experimental medicine**, v. 8, n. 7, p. 10548–57, 2015.

1 CHERVOVA, A. et al. Analysis of gene expression and mutation data points on contribution
2 of transcription to the mutagenesis by APOBEC enzymes. **NAR Cancer**, v. 3, n. 3, 2 jul. 2021.

3 COSER, J. et al. Cervical human papillomavirus infection and persistence: a clinic-based study
4 in the countryside from South Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n.
5 1, p. 61–68, 1 jan. 2016.

6 CURTI, R. R. DE J. et al. Development of cervical intraepithelial lesions and cervical cancer is
7 not influenced by SOD2 RS4880 polymorphism. **Pathology - Research and Practice**, v. 230,
8 p. 153742, fev. 2022.

9 DE SANJOSÉ, S. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human
10 papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet Infectious**
11 **Diseases**, v. 7, n. 7, p. 453–459, jul. 2007.

12 DELLA FERA, A. N. et al. Persistent Human Papillomavirus Infection. **Viruses**, v. 13, n. 2, p.
13 321, 20 fev. 2021.

14 DOORBAR, J. Host control of human papillomavirus infection and disease. **Best Practice &**
15 **Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 27–41, 1 fev. 2018.

16 DOS SANTOS, M. et al. Genetic Variability of Inflammatory Genes in the Brazilian
17 Population. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 17, n. 11, p. 844–848, 1 nov.
18 2013.

19 GANSMO, L. B. et al. APOBEC3A/B deletion polymorphism and cancer risk. **Carcinogenesis**,
20 v. 39, n. 2, p. 118–124, 9 fev. 2018.

21 GANSMO, L. B. et al. Impact of the APOBEC3A/B deletion polymorphism on risk of ovarian
22 cancer. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 23463, 6 dez. 2021.

23 GRANADILLO RODRÍGUEZ, M.; FLATH, B.; CHELICO, L. The interesting relationship
24 between APOBEC3 deoxycytidine deaminases and cancer: a long road ahead. **Open Biology**,
25 v. 10, n. 12, p. 200188, 9 dez. 2020.

26 GREEN, A. M.; WEITZMAN, M. D. The spectrum of APOBEC3 activity: From anti-viral
27 agents to anti-cancer opportunities. **DNA Repair**, v. 83, p. 102700, 1 nov. 2019.

28 HENDERSON, S.; FENTON, T. APOBEC3 genes: retroviral restriction factors to cancer
29 drivers. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 5, p. 274–284, 1 maio 2015.

30 INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil**. INCA
31 ed. Rio de Janeiro: 2019, 2019. v. 148

32 KIDD, J. M. et al. Population Stratification of a Common APOBEC Gene Deletion
33 Polymorphism. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 4, p. e63, 20 abr. 2007.

1 KLONOWSKA, K. et al. The 30 kb deletion in the APOBEC3 cluster decreases APOBEC3A
2 and APOBEC3B expression and creates a transcriptionally active hybrid gene but does not
3 associate with breast cancer in the European population. **Oncotarget**, v. 8, n. 44, p. 76357–
4 76374, 29 set. 2017.

5 MARANGON, A. V. et al. The association of the immune response genes to human
6 papillomavirus- related cervical disease in a Brazilian population. **BioMed Research**
7 **International**, v. 2013, 2013.

8 MCBRIDE, A. A. Human papillomaviruses: diversity, infection and host interactions. **Nature**
9 **Reviews Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 95–108, 14 fev. 2022.

10 MIDDLEBROOKS, C. D. et al. Association of germline variants in the APOBEC3 region with
11 cancer risk and enrichment with APOBEC-signature mutations in tumors. **Nature Genetics**, v.
12 48, n. 11, p. 1330–1338, 19 nov. 2016.

13 NIK-ZAINAL, S. et al. Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A
14 and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer.
15 **Nature Genetics**, v. 46, n. 5, p. 487–491, 13 maio 2014.

16 OKUYAMA, N. C. M. et al. Genetic variant in CXCL12 gene raises susceptibility to HPV
17 infection and squamous intraepithelial lesions development: a case-control study. **Journal of**
18 **Biomedical Science**, v. 25, n. 1, p. 69, 18 dez. 2018.

19 PAN, J. et al. Germline APOBEC3B deletion increases somatic hypermutation in Asian breast
20 cancer that is associated with Her2 subtype, PIK3CA mutations and immune activation.
21 **International Journal of Cancer**, v. 148, n. 10, p. 2489–2501, 15 maio 2021.

22 RAMAKRISHNAN, S.; PARTRICIA, S.; MATHAN, G. Overview of high-risk HPV's 16 and
23 18 infected cervical cancer: Pathogenesis to prevention. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.
24 70, n. C, p. 103–110, mar. 2015.

25 REVATHIDEVI, S. et al. Analysis of APOBEC3A/3B germline deletion polymorphism in
26 breast, cervical and oral cancers from South India and its impact on miRNA regulation. **Tumor**
27 **Biology**, v. 37, n. 9, p. 11983–11990, 2016.

28 REVATHIDEVI, S. et al. APOBEC: A molecular driver in cervical cancer pathogenesis.
29 **Cancer Letters**, v. 496, p. 104–116, 1 jan. 2021.

30 RIVA, G. et al. HPV Meets APOBEC: New Players in Head and Neck Cancer. **International**
31 **Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1402, 30 jan. 2021.

32 SADEGHPOUR, S. et al. Human APOBEC3 Variations and Viral Infection. **Viruses**, v. 13, n.
33 7, p. 1366, 14 jul. 2021.

1 SALTER, J. D.; BENNETT, R. P.; SMITH, H. C. The APOBEC Protein Family: United by
2 Structure, Divergent in Function. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 578–594, 1
3 jul. 2016.

4 SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews**
5 **Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 16086, 22 dez. 2016.

6 SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human Papillomavirus Infection and the Multistage
7 Carcinogenesis of Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 22,
8 n. 4, p. 553–560, 2 abr. 2013.

9 SMITH, N. J.; FENTON, T. R. The APOBEC3 genes and their role in cancer: insights from
10 human papillomavirus. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 62, n. 4, p. R269–R287, 1
11 maio 2019.

12 SUGAWARA, Y. et al. Cigarette smoking and cervical cancer risk: an evaluation based on a
13 systematic review and meta-analysis among Japanese women. **Japanese Journal of Clinical**
14 **Oncology**, v. 49, n. 1, p. 77–86, 1 jan. 2019.

15 TRUGILO, K. P. et al. Polymorphisms in the TGFB1 signal peptide influence human
16 papillomavirus infection and development of cervical lesions. **Medical Microbiology and**
17 **Immunology**, v. 208, n. 1, p. 49–58, 30 fev. 2019.

18 TSUCHIYA, C. et al. O câncer de colo do útero no Brasil: uma retrospectiva sobre as políticas
19 públicas voltadas à saúde da mulher. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 1, p.
20 137–147, abr. 2017.

21 VAN DER WAAL, D. et al. Risk prediction of cervical abnormalities: The value of
22 sociodemographic and lifestyle factors in addition to HPV status. **Preventive Medicine**, v. 130,
23 p. 105927, 1 jan. 2020.

24 WARREN, C. et al. Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in Human Papillomavirus Infection
25 and Disease Progression. **Viruses**, v. 9, n. 8, p. 233, 21 ago. 2017.

26 WESTRICH, J. A. et al. Human Papillomavirus 16 E7 Stabilizes APOBEC3A Protein by
27 Inhibiting Cullin 2-Dependent Protein Degradation. **Journal of Virology**, v. 92, n. 7, abr. 2018.

28 WHO. **Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health**
29 **problem and its associated goals and targets for the period 2020 – 2030**. [s.l.: s.n.]. v. 2
30
31
32
33

1 **5. CONCLUSÃO**

2
3 No presente trabalho, 369 mulheres atendidas pelo serviço público de saúde
4 na região norte do Paraná foram genotipadas para o polimorfismo A3A/B e avaliadas
5 quanto a presença da infecção pelo HPV. Quando havia presença da infecção,
6 classificadas de acordo com o grau de lesão cervical.

7 A associação entre as características socioepidemiológicas com a infecção
8 pelo HPV e o desenvolvimento de lesões cervicais corroborou com estudos anteriores
9 do nosso e de outros grupos. As variáveis associadas a infecção foram idade,
10 tabagismo, renda mensal, sexarca, uso de anticoncepcionais e preservativos. Para o
11 desenvolvimento de lesões além dessas variáveis o nível de escolaridade também foi
12 significativo.

13 Em relação ao polimorfismo A3A/B o genótipos encontrados foram equivalentes
14 em ambos os grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HPV, não houve
15 diferenças significativas com relação a infecção.

16 Não houve associação entre polimorfismo de deleção APOBEC3A/B com a
17 infecção pelo HPV e com o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e
18 câncer do colo do útero.

1 **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2

3 O câncer do colo do útero é o terceiro tipo mais incidente nas mulheres
4 brasileiras e representa um problema de saúde pública que evidencia as
5 desigualdades socioeconômicas e culturais presentes em nossa sociedade. Dito isto,
6 este trabalho corrobora com a caracterização da população mais afetada por esse
7 câncer e debate a intersecção desses aspectos, além de discutir pela primeira vez a
8 não associação da infecção pelo HPV e neoplasias cervicais com o polimorfismo
9 A3A/B em uma população miscigenada no sul do Brasil. Dessa forma, este trabalho
10 contribui para a caracterização dos fatores inerentes à complexidade do
11 desenvolvimento do câncer cervical, sendo fundamental para respaldar medidas que
12 melhorem a prevenção, diagnóstico, tratamento e prognóstico das pacientes.

1

APÊNDICES

2

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

"Prevalência e genotipagem de HPV e sua possível associação com os genes de citocinas, quimiocinas e seus receptores em nível de DNA, RNA e proteína: implicações no microambiente tumoral."

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **"Prevalência e genotipagem de HPV e sua possível associação com os genes de citocinas, quimiocinas e seus receptores em nível de DNA, RNA e proteína: implicações no microambiente tumoral."**, realizada no **"Laboratório de Genética Molecular e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina"**. O objetivo da pesquisa é avaliar a presença do vírus em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer cervical do setor público de saúde da região norte do Paraná, por meio de metodologia específica e sensível, visando também à associação de dados demográficos, para análise dos fatores de risco que contribuem para a exposição da população ao vírus, bem como os determinantes de sua manutenção. Adicionalmente objetiva-se compreender o papel do sistema imune no controle e iniciação tumoral, bem como na sua formação, crescimento e progressão, em especial avaliar a interação tumor-hospedeiro em pacientes portadoras do vírus HPV e no desenvolvimento do câncer cervical. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: **doação de 5mL de sangue periférico coletado por punção venosa e doação do swab cervico-vaginal utilizado para confecção das lâminas para o exame preventivo para análises moleculares, bem como responder um questionário sociodemográfico.** Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

As amostras biológicas (sangue periférico e secreção cervico-vaginal) serão utilizados para extração de DNA e RNA para análises moleculares e imunológicas. Estes materiais serão obtidos em pequenas quantidades portanto não haverá sobra de material biológico.

Os benefícios esperados são a detecção precoce do vírus HPV em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo de útero do setor público de saúde da região norte do Paraná. Informamos que a paciente que se dispôr a participar do projeto não sofrerá desconfortos nem riscos à saúde, não havendo qualquer prejuízo às mesmas. Informamos que a senhora não pagará nem será remunerada por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar **Karen Brajão de Oliveira, Laboratório de Genética Molecular e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, 3371-4267, karen.brajao@uel.br**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 201__

Pesquisador Responsável 
Profª. Drª. Karen Brajão de Oliveira
RG: 6.538.742-5

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____
Data: _____

3

Nº LAB

ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO SOCIOEPIDEMIOLÓGICO

Data: ___/___/___

Reg. N° _____

1. Telefone: _____
- Email: _____
2. Conhece o HPV???
- () **Nunca ouvi falar**
- () **Já ouvi falar mas não sei o que é**
- () **Conheço**
3. Conhece as formas de transmissão ou formas de contrair o vírus?
- () **Não** () **Sim** Qual ou quais: _____
4. Idade _____ anos DN, _____
5. Etnia: _____
- Branca / parda / negra / asiática / indígena
6. Sua renda mensal (em salário mínimo) é de?
- () **Até 1 Salário** () **De 1 à 3 salários**
- () **De 3 à 5 salários** () **De 5 à 7 salários**
- () **De 7 à 10 salários**
7. Você fuma?
- () **Não**
- () **Sim** Tempo: _____
- () **Ex-fumante** tempo que fumou _____
- Quando parou _____
8. Qual o seu grau de escolaridade?
- () **Fundamental Incompleto**
- () **Fundamental Completo**
- () **Médio Incompleto** () **Médio completo**
- () **Superior incompleto** () **Sup. completo**
9. Estado Civil:
- () **Solteira** () **Casada / união estável**
- () **Divorciada/separada** () **Viúva**
10. Qual sua profissão? _____
11. Faz o uso de anticoncepcional? () **N** () **S**
- Qual _____
12. Faz uso de preservativo ? () **N** () **S**
13. Nº Gestações: _____
14. Números de Partos Normais: _____
15. Numero de cesárea: _____
16. Abortos: _____
17. Idade da 1ª relação sexual: _____ anos
18. Idade da 1ª menstruação: _____ anos
19. Número de parceiros sexuais: _____
- durante a vida: _____
- nos últimos 6 meses: _____ .
20. Já realizou outros exames preventivos?
- () **Sim** () **Não**
21. Com qual frequência realiza os preventivos?
- Último exame: _____
22. Existem casos de câncer de colo de útero em sua família?
- () **Sim** () **Não**
- Em caso de resposta "SIM" descrever o grau de parentesco: _____
23. PESO _____
24. Altura _____
25. IMC: _____
26. Circunferência abdominal: _____
27. Faz algum tipo de tratamento para outra doença? Qual?
- _____
28. Está na menopausa? _____
29. Faz reposição hormonal? _____
- Medicação: _____
28. Faz uso de bebida alcoólica? _____
- Com qual frequência? _____
- Pesquisador: _____

ANEXOS

ANEXO A – Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/UEL



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	133/2012
CAAE:	05505912.0.0000.5231
Processo:	19275/2012
Pesquisador(a):	Karen Brajão de Oliveira
Unidade/Orgão:	CCB – Departamento de Ciências Patológicas

Prezado(a) Senhor(a):

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"PREVALÊNCIA E GENOTIPAGEM DE HPV E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM OS GENES DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES EM NÍVEL DE DNA, RNA E PROTEÍNA: implicações no microambiente tumoral."

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá ser encaminhado ao CEP/UEL relatório final da pesquisa, conforme prevê a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares.

Londrina, 28 de agosto de 2012.

Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Paula Mariza Zedei Alliprandini
Vice-Coord. de Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina