

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde
Mestrado

**DIVERSIDADE BACTERIANA EM CARCINOMA
PENIANO: UMA ABORDAGEM MICROBIÔMICA**

AMANDA JORDÃO SILVA DE DEUS

São Luís-MA

2022

AMANDA JORDÃO SILVA DE DEUS

**DIVERSIDADE BACTERIANA EM CARCINOMA
PENIANO: UMA ABORDAGEM MICROBIÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira

Co-orientadora: Profa.Dra. Hivana Patricia Melo Barbosa Dall'Agoll

São Luís- MA

2022

AMANDA JORDÃO SILVA DE DEUS

**DIVERSIDADE BACTERIANA EM CARCINOMA
PENIANO: UMA ABORDAGEM MICROBIÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
1º examinador

Prof. Dr. José de Ribamar Rodrigues Calixto
2º examinador

1º suplente
Profª. Dra. Cristina Monteiro de Andrade

2º suplente
Profª. Dra. Ana Paula Azevedo dos Santos Silva

*“A tarefa não é tanto ver aquilo
que ninguém viu, mas pensar o
que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo
vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos pacientes. Estamos fazendo nosso melhor em pesquisa para mudar a realidade do nosso Estado. Que o futuro seja de muitas curas para o câncer.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar por me abençoar no meu caminho, nas minhas escolhas de vida, nas dificuldades e nas alegrias do dia a dia.

A minha mãe, Ana Cristina Jordão, por ser meu porto seguro, minha maior incentivadora, que acredita mais em mim do que eu mesma.

Ao meu pai, João Batista por me dar calma e tranquilidade e sempre dizendo que as coisas vão dar certo.

Ao meu marido, Igor Nascimento que mais do que ninguém sabe das minhas lutas, meus desafios, minhas angústias e apoia minhas decisões com ternura e suavidade.

Ao meu filho, Iago Jordão, meu presente do ano de 2021, que veio para mostrar que eu não tenho controle de tudo e que mesmo assim as coisas que são para acontecer acontecem e tudo bem. Me mostrou o maior amor do mundo e me mostrou também que a maior prioridade que temos nessa vida é a nossa família!

Aos pacientes que pude tratar de forma cirúrgica, de forma clínica, de forma pessoal e espiritual, esta última com palavras de afeto e compaixão pela dor do outro.

Às professoras, Silma Pereira, Hivana Barbosa e Ana Paula da Silva que sempre foram muito presentes e nunca mediram esforço para me ajudar em várias etapas desse projeto, me orientando e guiando para a melhor realização desse trabalho, sou muito grata a vocês! Agradeço também a Raquel Riyuzo, nossa bioinformata que me explicou e tirou diversas dúvidas.

Agradeço ao Jenilson da Silva, meu parceiro de mestrado que sempre me ajudou nas menores dúvidas possíveis e nunca me julgou por não saber pequenos detalhes.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	5
LISTA DE TABELAS.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. Introdução.....	Erro! Indicador não definido.
2. Referencial teórico.....	Erro! Indicador não definido.
2.1 Câncer de pênis.....	Erro! Indicador não definido.
2.1.1 Epidemiologia e fatores de risco	Erro! Indicador não definido.
2.1.2 Base genética do Carcinoma Peniano	Erro! Indicador não definido.
2.1.3 Aspectos clínicos	Erro! Indicador não definido.
2.1.4 Tratamento de Carcinoma Peniano	Erro! Indicador não definido.
2.2 Microrganismos e câncer	Erro! Indicador não definido.
2.2.1 Microbiota de pênis	Erro! Indicador não definido.
3. Hipótese.....	Erro! Indicador não definido.
4. Objetivos	Erro! Indicador não definido.
4.1 Geral	Erro! Indicador não definido.
4.2 Específicos	Erro! Indicador não definido.
5. Material e métodos	Erro! Indicador não definido.
5.1 Sujeitos da pesquisa e aspectos éticos	Erro! Indicador não definido.
5.2 Caracterização da população.....	Erro! Indicador não definido.
5.3 Obtenção de DNA metagenômico	Erro! Indicador não definido.
5.4 Genotipagem do HPV e Caracterização molecular de genes da via inflamatória	Erro! Indicador não definido.
5.5 Amplificação de sequências do gene rRNA	Erro! Indicador não definido.
5.6 Sequenciamento dos amplicons	Erro! Indicador não definido.
5.7 Análise das sequências por bioinformática.....	Erro! Indicador não definido.
5.7.1 Controle de qualidade, filtragem e remoção de sequências quiméricas	Erro! Indicador não definido.
5.7.2 Construção da tabela de ASVs e atribuição da taxonomia	Erro! Indicador não definido.
5.7.3 Análise de Diversidade	Erro! Indicador não definido.
5.8 Análise comparativa da microbiota de cânceres associados a HPV ...	Erro! Indicador não definido.
5.9 Análise de dados funcionais.....	Erro! Indicador não definido.
5.10 Estatística	Erro! Indicador não definido.
6. Resultados.....	Erro! Indicador não definido.
6.1 Alfa e beta diversidade	Erro! Indicador não definido.
6.2 Análise global: tumor peniano <i>versus</i> tecido não tumoral adjacente ...	Erro! Indicador não definido.

6.3	Análise do microbioma <i>core</i>	Erro! Indicador não definido.
6.4	Abundância diferencial com análises pareadas de ASVs	Erro! Indicador não definido.
6.6	Análise funcional.....	Erro! Indicador não definido.
7.	Discussão	Erro! Indicador não definido.
8.	Conclusão.....	Erro! Indicador não definido.
9.	Referências.....	Erro! Indicador não definido.
10.	Material Suplementar.....	Erro! Indicador não definido.
11.	Anexos	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCE-P	Carcinoma de Células Escamosas do Pênis
CCE-CP	Carcinoma de Células Escamosas da Cabeça e Pescoço
CCE-C	Carcinoma de Células Escamosas de Cérvix
NGS	Next-Generation Sequencing
HPV	Papilomavírus Humano
CEC	Carcinoma de Células Escamosas
AJCC	American Joint Committee on Cancer
IUAC	International Union Against Cancer
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
TLN	Tampão de Lise Nuclear
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
ASV	Variantes de Sequências Únicas
LABGEM	Laboratório de Genética e Biologia Molecular
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
CONEP	Comitê Nacional de Pesquisa
DADA2	<i>Divisive Amplicon Denoising Algorithm-2</i>
QIIME2	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumours
PICRUST	Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de classificação TNM para Câncer de Pênis de acordo com o *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e a *International Union Against Cancer (IUAC)* 2017.

Tabela 2. Dados clínico-histopatológicos de pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Pênis HPV positivos (n=19).

Tabela 3. Abundância relativa da composição taxonômica a nível de filo em tecidos tumorais e não-tumorais adjacentes de Carcinoma de Células Escamosas de Pênis. O p-value foi calculado pelo Teste T, amostras pareadas.

Tabela 4. Abundância relativa da composição taxonômica a nível de gênero em tecidos tumorais e não-tumorais adjacentes de Carcinoma de Células Escamosas de Pênis. O p-value foi calculado pelo Teste T, amostras pareadas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Beta-diversidade de microrganismos de pacientes com CCEP deste estudo (n=38). Em A) análise Bray-Curtis entre amostras de tecido tumoral e não-tumoral adjacente; Em B) análise Unweighted Unifrac apenas com pacientes de estadiamento avançado (pT2 e pT3) versus tecido não-tumoral adjacente. (p=0,08).

Figura 2. Comparação entre a diversidade observada no tecido tumoral (T) e não-tumoral (N) dos 7 filos mais abundantes nos microbiomas de pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Pênis deste estudo (n=38).

Figura 3. Abundância de gêneros microbianos em pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Pênis deste estudo (n=38). Gêneros mais abundantes em microbiomas de amostras de tecidos tumorais (T) e não-tumorais (N).

Figura 4: Abundância diferencial entre análises pareadas de ASVs nos tecidos tumorais e não-tumorais adjacentes. ASVs à nível de gênero são mostradas no eixo (y) à direita e nível de família (cores) ao qual esses gêneros pertencem estão no eixo (y) à esquerda. No eixo (x) mostram valores negativos "*log2 Fold Change*" que indicam maior abundância em amostras tumorais e valores positivos indicam maiores abundâncias em tecido não-tumoral adjacente; p-valor<0,05.

Figura 5. Análise comparativa entre número de filos (**A**) e gêneros (**B**) microbianos descritos em tumores associados a HPV. CCE-P=Carcinoma de Células Escamosas de Pênis; CCE-CP: Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço; CCE-C: Carcinoma de Células Escamosas de Cérvix; CV=Carcinoma de Vulva.

Figura 6. Análise funcional. Diferença de abundância relativa das vias funcionais preditas pelo PICRUST2, entre amostras tumorais e não-tumorais de CCEP. Todas as 6 vias apresentam p-value <0,05 para teste-T pareado, a figura foi gerada através do software R utilizando o R Studio e os pacotes *vegan* e *ggplo2*.

RESUMO

O Carcinoma de Pênis é raro e representa menos de 0,5% de todos os cânceres em homens do mundo. No Brasil possui taxas de incidência que variam entre 2,9 e 6,8%, afetando principalmente indivíduos com baixo nível socioeconômico e educacional, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste. A má higiene na região genital, dificultada pela ausência de circuncisão da glândula, proporciona uma proliferação microbiana e resulta no acúmulo de secreções, como o esmegma, que pode causar inflamação crônica do epitélio e contribuir para o estabelecimento do tumor. O avanço das técnicas moleculares aplicadas à identificação de microrganismos tem impulsionado o conhecimento sobre a relação da flora microbiológica em alguns cânceres. No entanto, não há relatos sobre o microbioma em tumores de pênis. Dessa forma, este trabalho é pioneiro em identificar, por meio de uma abordagem microbiômica, a diversidade bacteriana em Carcinoma de Células Escamosas do Pênis (CCEP), e sua relação com a etiopatogenia desse tumor. Para isso, amostras de tecido tumoral pareadas com tecidos não-tumorais adjacentes ao tumor primário foram coletadas de 19 pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de CCEP, virgens de tratamento. Todos os pacientes (idade de 62.6 ± 16.5 anos) apresentaram infecção por HPV, a maioria de alto risco oncológico (79%) com baixo nível de escolaridade, 78,9% possuíam tumores localizados em glândula e prepúcio e 73% dos tumores eram avançados (pT2 ou pT3), resultando em cirurgias de penectomia total (21%) ou parcial (73%). O sequenciamento de nova geração (SNG) foi realizado a partir de DNA extraído dos tecidos tumorais e não-tumorais, e a biblioteca genômica foi preparada seguindo protocolo da *Neoprosecta Microbiome Technologies*, Brasil. A região V3-V4 do gene 16S rRNA e os amplicons de cada amostra foram indexados e sequenciados utilizando o *MiSeq Sequencing System* (Illumina Inc., EUA). A qualidade das sequências foi avaliada pelo *software* FastQC v.0.11.8. A análise de bioinformática (DADA2, QIIME2 v.2020.2) foi usada para classificar e avaliar a diversidade do microbioma, tanto no tumor primário, quanto no tecido não-tumoral adjacente. Foi realizado um levantamento bibliográfico buscando dados de microbioma de tecido peniano não-tumoral e de tecidos de tumores associados a HPV, com histopatologia semelhante a CCEP. O PICRUST2 foi utilizado para prever a composição funcional. Na análise global das amostras foi verificado que os filos *Proteobacteria* e *Firmicutes*, assim como os gêneros *Alcaligenes* e *Fusobacterium*, foram os mais abundantes em ambos os tecidos, sendo que os filos *Fusobacteriota* e *Campylobacterota* e os gêneros *Fusobacterium* e *Chromobacterium* foram estatisticamente significativos quando comparados com suas amostras pareadas. Ressaltamos a ocorrência de bactérias associadas ao processo inflamatório, tanto nos filos quanto nos gêneros mais abundantes, tais como: *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella*. Por outro lado, não foi observada abundância relativa significativa de *Mycobacterium*. Apesar de não ter sido observada diferença estatística nas diversidades alfa e beta das amostras pareadas, análise estratificada dos pacientes mostrou que para tumores avançados (pT2 e pT3) houve uma tendência para formação de dois grupos distintos caracterizados por gêneros bacterianos diferentes ($p=0,08$). Identificamos que *Prevotella* é comum para CCEP, CCECP, CCEC e CV, enquanto os gêneros *Alcaligenes*, *Eubacterium*, *yurii group* e *Pseudoglutamicibacter*, são específicos para CCEP. A análise funcional revelou 35 top vias, dentre as quais seis apresentaram maior poder de predição (p-value e diferença de abundância): degradação de quitina, degradação de mio-inositol, degradação de mio-chiro e scyllo-inositol, degradação de hexuronato, biosíntese de sacarose e degradação do oligômero nylon-6. Além disso foram relatadas ASVs (Amplicon Sequence Variants) únicas e abundantes dos gêneros *Alcaligenes*, *Streptobacillus* e *Bacillus* nos tecidos tumorais ($p<0,05$) enquanto ASVs únicas dos gêneros *Cupriavidus*, *Staphylococcus* e *Fingoldia* foram mais abundantes nos tecidos não-tumorais adjacentes ($p<0,05$). Os resultados mostraram uma microbiota de CCEP abundante, mas também com ASVs únicas, além de apresentar táxons bacterianos e vias moleculares relacionadas aos processos inflamatórios, ratificando o papel da inflamação na etiopatogênese do CCEP, abrindo perspectivas de políticas públicas de prevenção, prognóstico e tratamento.

Palavras-chaves: Microbioma; câncer de pênis; HPV

ABSTRACT

Penile Carcinoma is rare and represents less than 0.5% of all cancers in men worldwide. In Brazil, it has incidence rates that vary between 2.9 and 6.8%, mainly affecting individuals with low socioeconomic and educational levels, especially in the North and Northeast regions. Poor hygiene in the genital region, made difficult by the absence of circumcision of the glans, leads to microbial proliferation and results in the accumulation of secretions, such as smegma, which can cause chronic inflammation of the epithelium and contribute to the establishment of the tumor. The advancement of molecular techniques applied to the identification of microorganisms has boosted knowledge about the relationship between the microbiological flora in some cancers. However, there are no reports on the microbiome in penile tumors. Thus, this work is a pioneer in identifying, through a microbiomic approach, the bacterial diversity in Penile Squamous Cell Carcinoma (PSCC), and its relationship with the etiopathogenesis of this tumor. For this, samples of tumor tissue paired with non-tumor tissues adjacent to the primary tumor were collected from 19 treatment-naïve patients with clinical and histopathological diagnosis of PSCC. All patients (age 62.6 ± 16.5 years) had HPV infection, most of them at high oncogenic risk (79%) with low educational level, 78.9% had tumors located in the glans and foreskin and 73% of the tumors were advanced. (pT2 or pT3), resulting in total (21%) or partial (73%) penectomy surgeries. Next-generation sequencing (SNG) was performed using DNA extracted from tumor and non-tumor tissues, and the genomic library was prepared following the protocol of Neopropecta Microbiome Technologies, Brazil. The V3-V4 region of the 16S rRNA gene and the amplicons from each sample were indexed and sequenced using the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). The quality of the sequences was evaluated by FastQC v.0.11.8 software. Bioinformatics analysis (DADA2, QIIME2 v.2020.2) was used to classify and assess microbiome diversity in both the primary tumor and adjacent non-tumor tissue. A bibliographic survey was carried out seeking microbiome data from non-tumor penile tissue and from HPV-associated tumor tissues, with histopathology similar to PSCC. PICRUST2 was used to predict functional composition. In the global analysis of the samples, it was verified that the phyla *Proteobacteria* and *Firmicutes*, as well as the genera *Alcaligenes* and *Fusobacterium*, were the most abundant in both tissues, with the phyla *Fusobacteroidota* and *Campylobacterota* and the genera *Fusobacterium* and *Chromobacterium* being statistically significant when compared with their paired samples. We emphasize the occurrence of bacteria associated with the inflammatory process, both in phyla and in the most abundant genera, such as: *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella*. On the other hand, significant relative abundance of *Mycobacterium* was not observed. Although no statistical difference was observed in the alpha and beta diversities of the paired samples, stratified analysis of the patients showed that for advanced tumors (pT2 and pT3) there was a tendency for the formation of two distinct groups characterized by different bacterial genera ($p=0.08$). We identified that *Prevotella* is common for PSCC, SCCHN, CESC and VC, while the genera *Alcaligenes*, *Eubacterium*, *yurii* group and *Pseudoglutamicibacter* are specific for PSCC. The functional analysis revealed 35 top pathways, among which six had the highest predictive power (p-value and difference in abundance): chitin degradation, myo-inositol degradation, myo-chiro and scyllo-inositol degradation, hexuronate degradation, sucrose biosynthesis and nylon-6 oligomer degradation. In addition, unique and abundant ASVs (Amplicon Sequence Variants) from the genera *Alcaligenes*, *Streptobacillus* and *Bacillus* were reported in tumor tissues ($p<0.05$) while unique ASVs from the genera *Cupriavidus*, *Staphylococcus* and *Fingoldia* were more abundant in adjacent non-tumor tissues ($p<0.05$). The results showed an abundant PSCC microbiota, but also with unique ASVs, in addition to presenting bacterial taxa and molecular pathways related to inflammatory processes, confirming the role of inflammation in the etiopathogenesis of PSCC, opening perspectives for public policies for prevention, prognosis and treatment.

Keywords: Microbiome; penile cancer; HPV.