



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA – PPGIBA



**CARACTERÍSTICA SOCIODEMOGRÁFICA,  
EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E O VIROMA DE PACIENTES  
COM CÂNCER DE PÊNIS DO ESTADO DO AMAZONAS**

**VALQUÍRIA DO CARMO ALVES MARTINS**

**MANAUS – AMAZONAS**

**2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA – PPGIBA



Valquíria do Carmo Alves Martins

**CARACTERÍSTICA SOCIODEMOGRÁFICA,  
EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E O VIROMA DE PACIENTES  
COM CÂNCER DE PÊNIS DO ESTADO DO AMAZONAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador (a): **Prof. (a). Dr.(a). Kátia Luz Torres Silva**

Coorientador (a): **Prof. Dr. José Eduardo Levi**

**MANAUS – AMAZONAS**

**2019**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M386c Martins, Valquiria do Carmo Alves  
Característica sociodemográfica, epidemiológica, clínica e o viroma de pacientes com câncer de pênis do Estado do Amazonas / Valquiria do Carmo Alves Martins . 2019  
121 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Kátia Luz Torres Silva  
Coorientador: José Eduardo Levi  
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Câncer de pênis. 2. epidemiologia. 3. viroma. 4. metagenoma.  
5. Amazonas. I. Silva, Kátia Luz Torres. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS

**CARACTERÍSTICA SOCIODEMOGRÁFICA,  
EPIDEMIOLOGICA, CLÍNICA E O VIROMA DE PACIENTES  
COM CÂNCER DE PÊNIS DO ESTADO DO AMAZONAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Imunologia Básica e Aplicada.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr<sup>a</sup>. Kátia Luz Torres Silva (Presidente)  
Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas

Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca (Membro Interno)  
Instituto Leônidas e Maria Deane - Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy (Membro Interno)  
Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

Prof. Dr. Daniel Saito (Membro Externo)  
Universidade do Estado do Amazonas

Prof. Dr. André Salim Chama (Membro Externo)  
Universidade Federal do Pará

Manaus, 06 de dezembro de 2019.

## DEDICATÓRIA

*Aos pacientes da Fcecon, a minha família, em especial, aos meus filhos Laís e Leonardo e ao meu marido Renato...*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me permitiu avançar em mais uma fase da minha vida profissional.

A minha família que esteve sempre presente me apoiando nesta árdua caminhada. Ao meu marido **Renato Silva Martins** por todo amor, paciência. Aos meus filhos **Lais Alves Martins e Leonardo Alves** que são a razão da minha vida.

A minha amada mãe, **Maria da Penha Rodrigues Alves**, que sempre esteve ao meu lado, nos momentos fáceis e principalmente nos difíceis, sempre em oração para que no final tudo desse certo.

A minha orientadora e amiga Profa. Dra. **Kátia Luz Torres Silva**, pela amizade, pela fé na nossa capacidade e confiança para investir na minha formação acadêmica.

A todos os colegas da Diretoria de Ensino e Pesquisa da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas, pelo apoio, ensinamentos, parcerias, pela cumplicidade, palavras incentivadoras, risos garantidos e abraços apertados.

A todos os professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Imunologia Básica e Aplicada, pelos ensinamentos, auxílio e amizade.

Ao Prof. Dr. **José Eduardo Levi** (professor colaborador do Instituto de Medicina Tropical - Lab. de Virologia - da Universidade de São Paulo) pelos ensinamentos e por disponibilizar o laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paula para análises e aprendizagem.

Ao Dr. **Emmanuel Dias-Neto** e sua esplêndida equipe, responsável pelo Laboratório de Genômica Médica do A.C. Camargo Cancer Center, pelo apoio teórico e por disponibilizar o laboratório para análises de metagenômica.

A Dra. **Maria Galli de Amorim**, pesquisadora tecnologista no laboratório de Genômica Médica do A.C. Camargo Cancer Center, pelo apoio teórico e prático nas análises de metagenômica.

Ao serviço de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center em nome do Dr. **Fernando Augusto Soares**, Dra. **Isabela Werneck Cunha** e Dra. **Stephania Martins Bezerra** pelo apoio nas análises de imunohistoquímica.

Ao Laboratório de Virologia da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado em nome da Dra. **Márcia Castilho**, pela amizade, pelo apoio e suporte técnico dispensados. Em especial a Dra. **Michele de Souza Barrionuevo**, amiga, colega de trabalho e jornada, pelo incentivo, ensinamentos e sábios conselhos, e principalmente na colaboração nas análises de biologia molecular.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta em nome do Dr. **André Luiz Leturiondo**, pela amizade, pelo apoio e suporte técnico dispensados.

Ao Prof. Dr. **Felipe Naveca**, pelos ensinamentos fundamentais em biologia molecular e apoio nas análises de bioinformática.

Ao Prof. Dr. **Rajendranath Ramasawmy** pela amizade e confiança, pelos ensinamentos preciosos e pelas experiências compartilhadas.

As minhas queridas amigas **Heidy e Josyfashoin** que me confortaram em todos os momentos de insegurança e desânimo.

À **Fundação Centro de Controle em Oncologia**, minha segunda casa, em nome de toda a sua Diretoria e funcionários, que me permitiu traçar mais esta jornada.

Agradeço as sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

*Levantarei os meus olhos para os montes, de onde vem o meu socorro. O meu socorro vem do Senhor que fez o céu e a terra. Não deixará vacilar o teu pé; aquele que te guarda não tosquenejará.*

Salmos 121:1-3

## RESUMO

O Câncer de pênis (CP) não é uma neoplasia incomum em países em desenvolvimento. O Brasil aparece entre os países com alta incidência - particularmente nas regiões Norte e Nordeste. A etiologia desta neoplasia parece ser multifatorial; fimose, retenção de esmegma, processos inflamatórios, zoofilia, fumo, infecção por vírus oncogênicos como o Papilomavírus humano (HPV) e vírus Epstein-Barr (EBV) podem estar associadas ao surgimento da neoplasia. A aplicação do sequenciamento de nova geração (NGS) é uma estratégia promissora na descoberta de vírus potencialmente oncogênico em tecido tumoral. **Objetivo:** No intuito de compreender o perfil do paciente com CP, o presente estudo buscou descrever as características sociodemográficas, comportamentais, clínicas de pacientes com câncer de pênis atendidos em um hospital público de referência em oncologia na cidade Manaus, Amazonas – Brasil, bem como, caracterizar o viroma destes tumores. **Metodologia:** Quarenta e sete pacientes diagnosticados com câncer de pênis no período de 2013 a 2018 forma incluídos no estudo. Inicialmente foi realizada triagem para vírus oncogênicos (HPV e EBV) por PCR. Para a estudo viral por metagenômica foi utilizado o protocolo NetoVIR (*Novel enrichment technique of VIRomes*) **Resultados:** A idade média dos pacientes no momento do diagnóstico foi de 57,4 anos  $\pm$  DP 17,8, variando de 20 a 90 anos. A maioria dos pacientes apresentaram fimose e são procedentes do interior do estado do Amazonas ou de outros estados do Norte do país (64% e 77%, respectivamente). A infecção pelo HPV foi observada em 45% (21/47) dos casos. HPV 16 foi genótipo mais prevalente 61% (13/21). Outros genótipos de HPV foram detectados; HPV 6, 11, 42, 51, 53, 68 e 44/55. Infecção por EBV foi observada em 30% (14/47) dos pacientes com PC. Co-infecção com HPV e EBV foi observada em 25% (6/21) dos casos. A superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> foi observada exclusivamente em casos positivos para HPV 16 e em quatro casos negativos para HPV. Na análise de sobrevivência, o tempo de seguimento foi de 35,4 meses / paciente. A taxa de mortalidade durante o tempo de acompanhamento foi de 38%. Após a triagem para vírus oncogênico, treze (28%) pacientes – não identificados com HPV e EBV – seguiram para o estudo de metagenômica viral. Na análise bioinformática de high-throughput NGS para busca de vírus, foi realizada através de duas estratégias de análise: pelo Kraken resultaram em um intervalo de 190-2.232 reads (<0,1%) e pelo Kaiju/RVDB um intervalo de 458.189 - 1.277.735 reads (~6%). Pelo método de análise de metagenômica utilizado, não foi possível identificar vírus com potencial oncogênico nas amostras analisadas. Curiosamente, entre 10-70% das sequências permaneceram não classificadas, sugerindo o potencial de estudos de sequenciamento metagenômico de alto rendimento, para identificar novos microrganismos possivelmente relacionados ao câncer. **Conclusão:** A carcinogênese peniana tem etiologia heterogênea e pode estar relacionada a infecção pelo HPV ou mecanismos moleculares independentes do HPV. Neste estudo, 27% (13/47) dos pacientes com câncer de pênis não associado ao HPV/EBV foram analisados por NGS. Verificou-se que a maior parte do sequenciamento de DNA representa sequências não classificadas. A análise da bioinformática mostrou 99% de sequências mapearam contra o genoma humano, o que torna possível avaliar múltiplas alterações genéticas.

**Palavras-chave:** Câncer de pênis, epidemiologia, viroma, metagenoma, Amazonas

## ABSTRACT

Penile cancer is not an uncommon neoplasm in developing countries. Brazil appears among the countries with high incidence - particularly in the North and Northeast. The etiology of this neoplasm appears to be multifactorial; phimosis, retention of smegma, inflammatory processes, zoophilia, smoking, infection with oncogenic viruses such as Human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) may be associated with the onset of cancer. The application of next generation sequencing (NGS) is a promising strategy in the discovery of potentially oncogenic virus in tumor tissue. **Objectives:** In order to understand the profile of penile cancer patients in the region, this study aimed to describe the sociodemographic, behavioral, clinical and viroma characteristics of penile cancer patients treated at a public oncology referral hospital in Manaus, Amazonas - Brazil. **Methods:** Forty-seven patients diagnosed with penile cancer from 2013 to 2018 were included in the study. Initially screening for oncogenic viruses (HPV and EBV) was performed by PCR. For the viral study by metagenomics we used the protocol NetoVIR - Novel enrichment technique of VIRomes. **Results:** The mean age of patients at the time of diagnosis was 57.4 years  $\pm$ SD 17.8 ranging from 20 to 90 years old. Most patients had phimosis and come from the interior of the state of Amazonas or from other states (64% and 77%, respectively). HPV infection was observed in 45% (21/47) of cases. HPV16 was detected in 13 patients (61%). Other HPV types detected were HPV 6, 11, 42, 51, 53, 68 and 44/55. EBV infection was observed in 30% (14/47) of the patients with PC. The p16INK4a overexpression was observed exclusively in HPV 16 positive cases and four HPV negative cases. In the survival analysis, the follow-up time was 35.4 months/patient. The mortality rate during the follow up time was 38%. Thirteen patients with penile cancer non-HPV/EBV-associated were submitted viral metagenomic analysis. Bioinformatics analysis of high-throughput sequencing for virus detection combined two existing workflows which resulted in a range of 190-2,232 reads (< 0.1%) by Kraken and 458,189 – 1,277,735 reads (~6%) by Kaiju – RVDB. Interestingly, between 10-70% of the sequences remained unclassified, suggesting the potential of high throughput metagenomic sequencing studies, such as ours, to identify new microorganisms possibly related to cancer. **Conclusions:** Penile carcinogenesis has heterogeneous etiology and could be assigned HPV infection or molecular mechanisms independent of HPV. In this study, 27% (13/47) patients with penile cancer non-HPV/EBV-associated were analysed by NGS. Most of the DNA sequencing was found to represent unclassified sequences. As the bioinformatics analysis showed ~99% sequences to map against the human genome, it becomes possible to assess multiple genetic alterations and maybe to predict of outcome in penile cancer.

**Keywords:** Penile cancer, epidemiology, viroma, metagenomic, Amazon

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mortalidade proporcional não ajustada por câncer de pênis, Brasil e Região Norte, entre 2003 e 2017. Fonte: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade - SIMMP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE MS/INCA/Conprev/Divisão de Vigilância.....	04
<b>Figura 2.</b> Pacientes portadores de Câncer de pênis .....	13
<b>Figura 3.</b> Classificação dos tumores do pênis – WHO .....	14
<b>Figura 4.</b> Tratamento do câncer de pênis baseado na extensão do tumor primário.....	17
<b>Figura 5.</b> Potenciais adventos da análise metagenômica em virologia.....	19
<b>Figura 6.</b> Seleção dos pacientes e coleta das amostras de câncer de pênis.....	26
<b>Figura 7.</b> Fluxo de diagnóstico laboratorial das amostras de câncer de pênis.....	27
<b>Figura 8.</b> Genótipos de HPV detectáveis com o PapilloCheck®.....	32
<b>Figura 9.</b> Esquema de análise de metagenômica viral.....	34
<b>Figura10.</b> Biblioteca da amostra 62 A do estudo de metagenômica viral.....	37

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Sistema de estadiamento TNM e Classificação de Jackson .....	15
<b>Quadro 2.</b> Sistema de estadiamento TNM classificação patológica.....	16
<b>Quadro 3.</b> Sequência do <i>primer</i> PGMY09/11 .....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CP	Câncer de pênis
CCS	Carcinoma de células escamosas do pênis
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
E1	<i>Protein Early 1</i>
E2	<i>Protein Early 2</i>
E3	<i>Protein Early 3</i>
E4	<i>Protein Early 4</i>
E5	<i>Protein Early 5</i>
E6	<i>Protein Early 6</i>
E7	<i>Protein Early 7</i>
EBER	<i>Epstein-Barr Virus Encoded small RNA</i>
EBNA	<i>Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen</i>
EBV	vírus Epstein-Barr
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FCECON	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
HBsAg	Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HR-HPV	<i>High risk Human Papillomavirus</i>
HSIL	Lesões intraepiteliais de alto grau
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>

ILMD/Fiocruz Amazônia	Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane
IMT-SP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes Da Silva
L1	Proteína <i>Late 1</i>
L2	Proteína <i>Late 2</i>
LCR	<i>long control region</i>
LMP1	<i>Latent Membrane Protein 1</i>
LMP2A	<i>Latent Membrane Protein 2A</i>
LMP2B	<i>Latent Membrane Protein 2B</i>
LP	<i>Leader Protein</i>
LR-HPV	<i>Low risk Human Papillomavirus</i>
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MCC	Carcinoma de células de Merkel
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MS	Mistério da Saúde
na	Não se aplica
nd	Não disponível
nm	Nanômetros
ORF	<i>Open Reading Frame</i> - Fase aberta de leitura
p14	Proteína p14
p16	Proteína p16
p53	Proteína p53
pRB	Proteína do retinoblastoma
PAIC	Programa de Apoio a Iniciação Científica
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

pM	Pico molar
PM	Peso molecular
PPSUS	Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
s	Segundos
ta	Temperatura de anelamento
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
td	Temperatura de desnaturação
te	Temperatura de extensão
tm	Temperatura de fusão
TNM	Tumor, nódulo e metástase
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UICC-AJCC	<i>Union for International Cancer Control–American Joint Committee on Cancer</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
μl	Microlitro
μM	Micro molar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
2.1 Câncer de pênis .....	03
2.1.1 Epidemiologia .....	03
2.1.2 Fatores de risco .....	05
2.1.3 Vírus oncogênicos e o câncer de pênis .....	06
2.1.3.1 Papilomavírus humano (HPV) .....	06
2.1.3.2 Vírus Epstein-Barr (EBV).....	09
2.1.4 Mecanismos de Carcinogênese Peniana e resposta imune .....	11
2.1.5 Diagnóstico, estadiamento e tratamento.....	12
2.2 Metagenômica e a perspectiva de novos patógenos em tecidos tumorais.....	17
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	
4.1 Geral .....	22
4.2 Específicos .....	22
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
5.1 Tipo de estudo .....	23
5.2 População de estudo .....	23
5.3 Local de estudo .....	23
5.4 Cálculo amostral .....	24
5.5 Critérios de elegibilidade .....	24
5.5.1 Critério de inclusão .....	24
5.5.2 Critério de exclusão.....	24
5.6 Materiais e Métodos .....	25
5.6.1 Procedimentos de abordagem ao paciente com câncer de pênis, coleta de dados clínicos e epidemiológicos .....	25
5.6.2 Procedimentos de coleta e conservação de amostra biológica do câncer de pênis.....	25
5.6.3 Procedimentos de triagem laboratorial para vírus oncogênicos.....	26
5.6.3.1 Protocolo de extração dos ácidos nucleicos.....	27
5.6.3.2 Quantificação do DNA extraído.....	28
5.6.3.3 Protocolo de controle endógeno da reação em cadeia da polimerase .....	28

5.6.3.4 Protocolo de detecção e genotipagem de Papillomavirus Humano.....	28
5.6.3.5 Protocolo de detecção de EBV .....	33
5.6.3.6 Eletroforese.....	33
5.7 Sequenciamento de nova geração – NGS .....	34
5.7.1 Homogeneização do tecido tumoral.....	34
5.7.2 Enriquecimento de partículas virais.....	34
5.7.3 Extração e quantificação de DNA/RNA.....	36
5.7.4 Amplificação do DNA/RNA .....	36
5.7.5 Preparo da biblioteca.....	36
5.7.6 Sequenciamento das amostras .....	38
5.7.7 Análises de bioinformática.....	38
5.8 Aspectos éticos .....	38
5.9 Análise dos dados .....	39
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>8. PERSPECTIVAS E DESDOBRAMENTOS DO ESTUDO .....</b>	<b>43</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>
<b>10. ANEXOS</b>	
10.1 Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da UFAM.....	51
10.2 Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON.....	52
<b>11. APÊNDICES</b>	
11.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	53
11.2 Instrumento de coleta de dados .....	56
11.3 Artigo científico 01 .....	61
11.4 Artigo científico 02 .....	87

## 1. INTRODUÇÃO

A ocorrência do Câncer de Pênis (CP) pode variar nas diversas populações do mundo. Nos países desenvolvidos o tumor peniano apresenta baixa incidência, correspondendo a 0,3-1% das neoplasias malignas no homem (1). No entanto, em relação aos países em desenvolvimento a taxa de incidência do câncer de pênis é alta e preocupante (2). No Brasil, Fonseca et al. (2010) (3) realizaram um estudo epidemiológico relacionado ao câncer de pênis no Estado do Pará que revelou uma incidência alarmante, 15,7% dos tumores urogenitais no sexo masculino são neoplasias de pênis. De acordo com Favorito et al. (2008) (4), do total de casos de CP ocorrido no Brasil, no período do estudo, 53,02% eram provenientes das regiões Norte e Nordeste.

O câncer de pênis apresenta maior prevalência a partir da quinta década de vida, embora esta neoplasia possa acometer indivíduos nas diversas faixas etárias. Estudos epidemiológicos inferem existir uma relação entre o perfil socioeconômico dos portadores da neoplasia de pênis, sugerindo que homens de classe social e nível de instrução baixo estariam mais suscetíveis ao desenvolvimento do câncer de pênis (5).

As causas do câncer de pênis são multifatoriais, embora ainda não tenha sido encontrado um carcinógeno específico, alguns fatores de risco e/ou condição de risco estão bem consolidados. O primeiro fator etiológico está associado à presença de fimose e acúmulo de esmegma, sendo observada em mais de 80% dos pacientes com CP. A dificuldade de higienização, irritação crônica e processo inflamatório crônico do epitélio poderiam contribuir para carcinogênese de pênis (6).

Os hábitos sexuais das populações expostas tendem a configurar-se como um importante comportamento de risco, uma vez que o CP tem sido constantemente associado à infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) - vírus comumente transmitido sexualmente. A prevalência da infecção de HPV em CP é proximamente de 50%, podendo variar de 10 a 70%, essa variação se deve, principalmente, a escolha do método de detecção utilizado, a população estudada e ao tipo de amostra analisada. O genótipo mais prevalente é o HPV 16, com 30% dos casos (6-10).

Outro vírus que desponta como possível agente associado ao câncer de pênis é o vírus Epstein-Barr (EBV). Alves et al. (2004) (11) realizaram um estudo com 21 amostras de tumor de pênis e constataram que 95,5% foram identificadas com DNA de EBV e duas amostras positivas com expressão *Latent Membrane Protein-1* (LMP-1) foram observadas por imunohistoquímica. A expressão inapropriada destes genes latentes, envolvidos na persistência celular, poderia contribuir para o desenvolvimento de tumores (12). Afonso et al. (2012) (13) em estudo com 135 amostras de carcinoma de pênis demonstraram que 34% eram coinfectadas

para HPV e EBV. No entanto, o EBV parece atuar como um cofator e não como um carcinógeno primário (14).

Dada à necessidade de dados cientificamente concretos no conhecimento do câncer de pênis na região, e, da produção de dados epidemiológicos essenciais para o fortalecimento de políticas públicas eficazes voltadas para a saúde do homem, que um grupo de pesquisadores da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas - FCECON elaborou o projeto de pesquisa intitulado *“Caracterização epidemiológica e clínica dos pacientes portadores de carcinoma de células escamosas do pênis e associação com a infecção pelo Papilomavírus Humano”* entre os objetivos específicos do projeto, um deles foi descrever os principais fatores de risco para o CP no estado do Amazonas, demonstrando como os determinantes sociais de saúde interagem e a associação da infecção por HPV e o câncer de pênis(15). Entretanto, foi observado que 12% dos pacientes não apresentavam os principais fatores de risco relacionados a esta neoplasia (fimose, fumo ou infecção por HPV e EBV).

O surgimento da neoplasia poderia estar associado à progressão de lesões precursoras relacionada a duas vias principais; uma via referida a várias condições penianas como: inflamação, fimose ou história de líquen escleroso e outra via à infecção por HPV(16).O papel individual ou sinergismo de vírus conhecidamente oncogênicos, tais como o HPV e o EBV no início dos eventos carcinogênicos ainda necessitam ser elucidados. A abordagem metagenômica viral - que permite a identificação de microrganismos na ausência de seu isolamento - de lesões clínicas associadas ao ou não ao HPV, pode ser uma estratégia promissora na descoberta de novos HPVs patogênicos ou outros agentes virais associados à neoplasia (17).

Dentro deste contexto, o presente estudo buscou através metodologia de sequenciamento metagenômico de nova geração - ferramenta inovadora -“varredura de vírus” em amostras de câncer de pênis (HPV e EBV DNA – negativos), a fim de obter uma visão global de quais vírus conhecidos ou desconhecidos estão presentes na lesão e determinar as associações existentes entre a presença viral e aspectos clínicos e histopatológicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Câncer de pênis

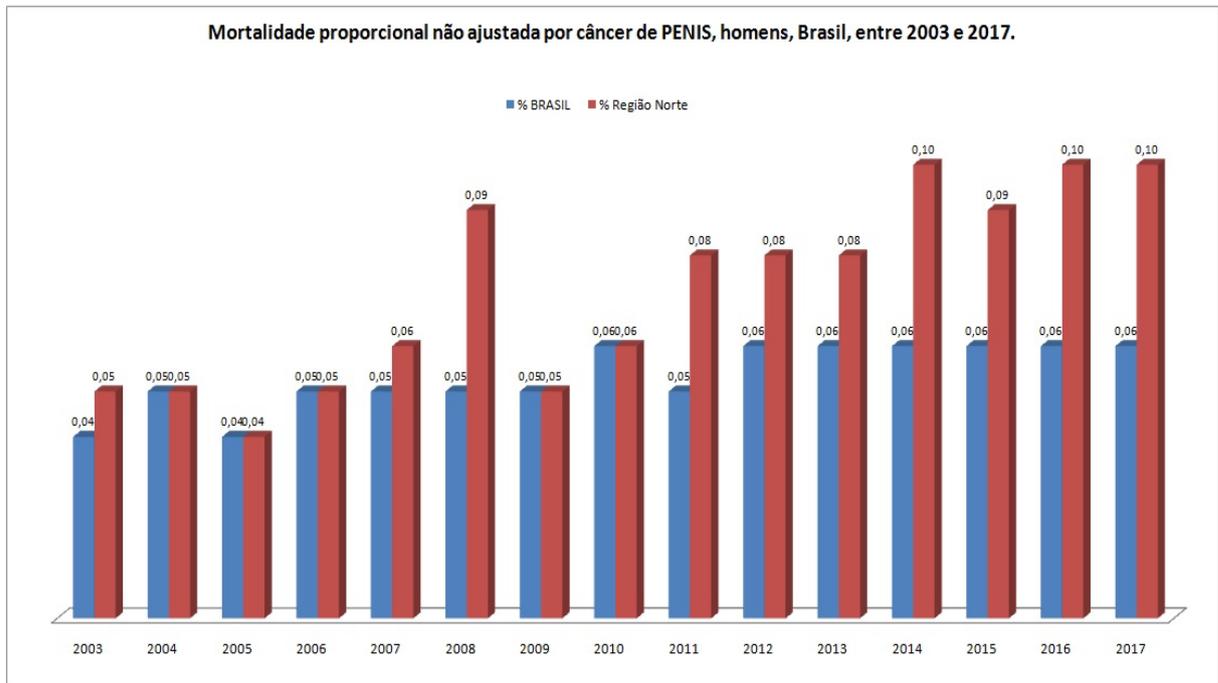
#### 2.1.1 Epidemiologia

Câncer de pênis (CP) é uma neoplasia rara em países desenvolvidos, correspondendo a uma incidência menor que 1/100.000 homens. A incidência na Europa e nos Estados Unidos varia entre: 0,1 a 0,9 por 100.000 e 0,7 a 0,9 por 100.000 homens, respectivamente. Nos Estados Unidos esta incidência denotou uma redução significativa ao longo dos anos (1, 8, 18, 19). No entanto, algumas regiões da Europa têm uma incidência superior a 1/100.000 homens, na Inglaterra, Arya et al.(2013) observou uma tendência de aumento na incidência do CP nos últimos anos, provavelmente por mudanças no comportamento sexual e exposição aos Papilomavírus humanos (HPV) (20).

Nos países em desenvolvimento a ocorrência desta neoplasia atinge níveis expressivos. Algumas regiões da América do Sul, da África e da Ásia essa doença pode representar mais de 10% dos tumores urogenitais masculinos (1, 21, 22). Em Uganda, país onde a incidência desta neoplasia era de 4,4/100.000 homens no período de 1993-1997 (23), houve uma redução significativa na incidência do câncer de pênis nos últimos anos, 2,4/100.000 homens no período de 2003-2007, isso pode ser relacionado à melhoria da higiene pessoal, com o programa de urbanização e disponibilidade de água encanada (24).

No Brasil, o CP corresponde aproximadamente a 2,1% de todos os tumores no homem. Nas regiões Norte e Nordeste do país, o CP é cinco vezes mais incidente em comparação com as regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste (4). No estado do Pará, estudo epidemiológico do câncer de pênis revelou uma incidência bruta de 5,7/100.000 homens/ano (3). E, esses tumores representavam 15,7% dos tumores urogenitais. Estes dados, embora bastante elementares, demonstram a necessidade de medidas de prevenção e controle a essa doença, principalmente, em regiões como o Norte e Nordeste do país (25).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) a mortalidade proporcional, não ajustada, por CP no Brasil, entre 2003 e 2017 foi em média 0,05%. Entretanto, a região Norte do país, no mesmo período, essa taxa dobrou, passando de 0,05% para 0,10% (26). A demonstração gráfica desta distribuição está representada na Figura 1.



**Figura 1.** Mortalidade proporcional, não ajustada, por câncer de pênis, Brasil e Região Norte, entre 2003 e 2017. Fonte: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade - SIMMP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE MS/INCA/Conprev/Divisão de Vigilância.

No estado do Amazonas, de acordo com o relatório anual de gestão da FCECON, no serviço de cirurgia urológica da FCECON é registrada uma média de 12 penectomias (parcial ou total) em pacientes portadores de câncer de pênis por ano (27). Este número representa apenas os casos de CP que foram encaminhados ao serviço de urologia e que foram conduzidos ao tratamento cirúrgico, sendo, portanto, um número que não representa o universo de casos de CP no Amazonas. E, ao avaliar a distribuição proporcional do total de mortes por câncer de pênis, segundo localização primária do tumor, homens, Amazonas, período 2008-2012 e período 2013-2017, houve uma variação de 0,58% para 0,70% (26). Caracterizando o câncer de pênis como uma doença com alta morbimortalidade no estado do Amazonas.

O câncer de pênis apresenta maior prevalência a partir da quinta década de vida, típica doença do homem da terceira idade, embora esta neoplasia possa acometer indivíduos nas diversas faixas etárias, independente de raça (5, 28). No Amazonas, em um estudo realizado por Figliuolo et al. (2015) (15) com 34 pacientes diagnosticados com CP, 12% apresentam idade entre 26 e 39 anos. Na Bahia, na pesquisa realizada por Paiva et al. (2015), (29) 17% dos participantes do estudo apresentam menos de 40 anos ao diagnóstico, este dado é um alerta para a ocorrência desta neoplasia em indivíduos jovens.

### 2.1.2 Fatores de Risco

As causas do câncer de pênis parecem ser multifatoriais, Calmon et al. (2011) (6) realizou estudo de revisão sistemática abrangente da literatura com discussões pertinentes e demonstrou que vários fatores de riscos têm sido relacionados ao surgimento do CP. O primeiro e mais importante fator etiológico está associado à presença de prepúcio e acúmulo de esmegma. O indivíduo com fimose pode ter dificuldade na higienização do órgão e a visualização dos estágios iniciais das lesões, a presença da fimose é observada em mais de 80% dos pacientes com CP (4, 30, 31). Em uma meta-análise realizada por Larke et al. (2011) com o objetivo de buscar associação entre circuncisão masculina e câncer de pênis, concluíram que indivíduos submetidos à circuncisão na infância ou na adolescência apresentam uma redução no risco de desenvolvimento do câncer de pênis, sendo a postectomia considerado como um fator protetor (32).

Outros fatores de risco relacionados ao surgimento do CP incluem o número de parceiros sexuais e a exposição ao tabaco, embora o mecanismo exato através do qual o tabaco é capaz de desencadear o processo neoplásico, ainda não tenha sido elucidado (33, 34). Os hábitos sexuais das populações expostas também tendem a configurar-se como um importante fator, uma vez que o CP tem sido constantemente associado à infecção pelo Papilomavírus humano (HPV), que é um agente patogênico que pode ser transmitido sexualmente (16, 21, 35, 36).

A história natural da infecção pelo HPV e o tabagismo como cofator na carcinogênese dos tumores de pênis é objeto de estudos. Nos tumores cervicais, os constituintes do cigarro poderiam suprimir a função imune local e assim favorecer tanto a carga viral quanto a persistência viral do HPV (37). Schabath et al. (2011) (38) num estudo de coorte que avaliou a prevalência de infecção pelo HPV e a associação ao tabagismo, para determinar o risco basal de infecção por HPV, observaram que o tabagismo foi associado a um risco aumentado a infecção por HPV (OR=1.19; IC 95%: 1,01 – 1,41). Sendo assim, como aproximadamente um terço dos homens em todo o mundo são fumantes ativos, estes estariam expostos a um risco aumentado de infecção e persistência viral do HPV, fator de risco significativo na carcinogênese do pênis.

O Líquen escleroso - caracterizado como processo inflamatório crônico de etiologia desconhecida que afeta a glândula do pênis, prepúcio e uretra - também é relacionado como um fator de risco para o carcinoma de células escamosas do pênis (6). No entanto, estudos sugerem que o Líquen escleroso deve atuar como um cofator e não como um carcinogênico primário. A

avaliação histopatológica cuidadosa e sistemática de qualquer placa ulcerada é fortemente recomendada e uma investigação mais aprofundada que inclua o acompanhamento a longo prazo e análise de rotina de infecção por HPV (39, 40).

Zequi et al. (2012) (41) realizaram um estudo multicêntrico de caso controle, e avaliaram as características de comportamento sexual e a possibilidade da associação com o câncer de pênis. Neste estudo é explorado o comportamento da zoofilia e o risco do desenvolvimento de doenças urológicas e principalmente seu envolvimento no câncer de pênis. Os autores apresentam evidência da zoofilia como fator de risco importante, concluindo que homens que realizam esta prática possuem duas vezes mais chance de desenvolver câncer de pênis. Esse comportamento poderia levar a infecção por agentes infecciosos presentes no ambiente externo, estes poderiam ser relacionados à carcinogênese de pênis.

### **2.1.3 Vírus oncogênicos e o câncer de pênis**

Os vírus são responsáveis por cerca de 20% do total de casos de câncer em seres humanos. Estes vírus incluem o vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), Papilomavírus humano (HPV), vírus Epstein-Barr (EBV), herpes vírus humano 8 (HHV8), polyomavírus de células de Merkel (MCPyV) e vírus linfotrópico humano 1 (HTLV-1). Os mecanismos moleculares de oncogênese virais são complexos e podem envolver a indução de inflamação crônica, perda da homeostase genética e epigenética do hospedeiro e interferência com o mecanismo de reparo do DNA celular, resultando em instabilidade do genoma e desregulação do ciclo celular (42).

Um foco contínuo de pesquisa no estudo do câncer de pênis é a associação de vírus oncogênicos e o surgimento de lesões malignas de pênis. Com o advento das técnicas de detecção de genoma viral por biologia molecular foi factível a identificação do genoma do Papilomavírus humano e vírus Epstein-Barrem células neoplásicas malignas penianas, havendo provável evidência do potencial oncogênico destes vírus no câncer de pênis (7, 13, 43).

#### **2.1.3.1 Papilomavírus humano (HPV)**

O Papilomavírus humano pertence à família *Papillomaviridae*. Esses vírus não envelopados apresentam uma única molécula de DNA de dupla hélice circular, fechada e com aproximadamente 7900 pares de base. O genoma do vírus é composto por uma região regulatória (LCR ou “*long control region*”) responsável pelo controle da transcrição e replicação viral, uma região precoce (“*Early*”) composta pelos genes E1 a E7 que codificam

proteínas envolvidas na transcrição/replicação viral, e uma região tardia (“Late”) que contém os genes L1 e L2 para a codificação das proteínas que compõe o capsídeo (44).

O mecanismo de transformação maligna do tecido é semelhante aquele observado no câncer cervical, mediado por dois genes virais E6 e E7 do vírus HPV, que estão ativamente transcritos em células infectadas (45). O HPV é capaz de alterar o ciclo celular pela expressão das proteínas virais E6 e E7 na inativação e eliminação dos produtos de genes supressores de tumor (p53 e pRb). Ambas as proteínas são responsáveis pela supressão tumoral, à perda da função estaria intimamente relacionada à progressão do processo neoplásico (30, 46-48) .

O papel desempenhado pelo HPV na carcinogênese do pênis parece ser semelhante ao câncer cervical. O HPV codifica os oncogenes E6 e E7, necessários para a transformação e manutenção maligna das células hospedeiras. As oncoproteínas virais (E6 e E7) podem comprometer a regulação do ciclo celular hospedeiro e levar a uma proliferação descontrolada (45, 49). P16 é um gene supressor de tumor e sua proteína é fisiologicamente expressa em tecidos normais. A inativação do gene do retinoblastoma (pRb) pelo HPV E7 resulta na superexpressão do p16<sup>INK4a</sup> devido à falta de loop de feedback negativo entre o pRb e a proteína p16(50). Foi demonstrado que a superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> em células tumorais se correlaciona com a detecção de DNA de HPV de alto risco em CP (51).

Existem mais de 180 genótipos de HPV identificados (Papillomavirus Episteme - PaVE <http://pave.niaid.nih.gov/#home>), estes podem ser classificados de acordo com o potencial oncogênico em alto e baixo risco. Os genótipos virais relacionados com o mecanismo carcinogênico são classificados de HPV de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59,66, 69, 73 e 82) e aqueles que praticamente não apresentam associação com o câncer são classificados de HPV de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 70, 72 e 81) (52-54).

A prevalência da infecção de HPV em CP é proximamente de 50% e pode variar, nos diversos estudos, de acordo com a população estudada, o número de pacientes e o método de identificação utilizado (55). O genótipo mais prevalente associado ao CP é o HPV16 com cerca de 30% dos casos. Além do genótipo 16, os genótipos 18, 6 e 11 também estão relacionados à prevalência de câncer de pênis (6-8, 10, 56).

Na revisão sistemática realizada por Bleeker et al. (2009) (16) na qual foram avaliados 30 estudos com 1.266 casos de carcinoma de células escamosas do pênis a prevalência de HPV foi de 47,9%, no subtipo histológico verrucoso 22,4% e no subtipo basalóide 66,3%. A prevalência de HPV também variou de acordo com a população, sendo a maior na Ásia com

59,3% e a menor na América do Sul com 39,7%. Nesta revisão não foram incluídos estudos da África. O HPV16 foi o genótipo mais prevalente com 30,8%, seguindo do HPV6 com 6,7% e o HPV18 com 6,6%. Miralles-Guri et al. (2009) (9) avaliaram 1.466 casos e observaram resultados semelhantes de prevalência de HPV 49,6%. Com uma distribuição genotípica mais abrangente; HPV16 (60,23%), HPV18 (13,35%), HPV 6/11 (8,13%), HPV31 (1,16%), HPV45 (1,16%), HPV33 (0,97%), HPV52 (0,58%) e outros tipos (2,47%).

Para melhor entender a infecção do HPV e o carcinoma de pênis Alemany et al. (2016)(10) realizaram um estudo que avaliaram não só a prevalência de HPV, mas também marcadores de atividade viral (E6\*I mRNA e p16<sup>INK4a</sup>) em uma série de 1010 carcinomas invasivos e 85 lesões intraepiteliais de alto grau e pacientes de 25 países. O HPV foi detectado em 33.1% dos carcinomas invasivos e 87.1% das lesões intra-epiteliais de alto. O genótipo de HPV mais prevalente nos carcinomas de pênis e nas lesões intra-epiteliais de alto foi o HPV16 com 79,6% e 68,7%, respectivamente, em conformidade com os relatos de Bleeker et al. (2009) e Miralles-Guri et al. (2009) (9, 16). A atividade viral foi detectada, por pelo menos um dos marcadores virais utilizados, em 85,3% dos casos, inferindo que o HPV estava ativo e envolvido no processo oncogênico. O segundo genótipo mais prevalente foi o HPV6 com 3,7% dos casos, o papel de genótipos de baixo risco de lesão na carcinogênese do pênis, em especial pelo seu comportamento clínico de positividade no carcinoma de pênis, merece estudos adicionais que avaliem os mecanismos dessa associação (57).

No Brasil, a variação descrita na prevalência de HPV no CP também é observada em alguns estudos. Bezerra et al.(2001) estudando amostras parafinadas detectaram HPV em 30,5% dos casos, o HPV16 foi o genótipo mais frequente com 52% dos casos, seguido por HPV18, HPV 6/11 e HPV45 com 16,0%, 8% e 4%, respectivamente (58). Scheiner et al. (2008) analisando amostras cirúrgicas de tumor, encontraram uma alta prevalência de HPV com 75% em carcinoma invasivo e 50% em carcinoma verrucoso, HPV16 foi o genótipo mais frequente com 20,7% e HPVs de baixo risco foram encontrados em 12% dos casos, sendo HPV6 o mais frequente com 6,9%. Apenas um caso de HPV18 foi observado 1,7%(59). Dados semelhantes foram observados por Sousa et al. (2015) em amostras parafinadas de carcinoma de pênis, infecção por HPV foi detectada em 63.1% das lesões e o genótipo mais comum foi o HPV16 com 21,28% e seguido do HPV11 e HPV18 com 12,76% e 8,51%, respectivamente (60).

Em geral o carcinoma de pênis surge partir da progressão das lesões precursoras e podem ser relacionados à infecção por HPV ou na ausência de HPV (18). Nos casos induzidos por HPV a infecção persistente é o evento causador iniciador, como observado na carcinogênese

cervical, e subsequentes alterações genéticas e/ou epigenética, frequentemente a integração ao DNA cromossômico da célula hospedeira, seja um evento crucial na progressão do câncer (61). Na ausência de HPV o desenvolvimento do câncer estaria associado a condições pró-inflamatórias, como balanite crônica, fimose e ao Líquen escleroso (6).

Nos tumores cervicais, 95-100% apresentam a infecção por HPV e o envolvimento do HPV na carcinogênese foi completamente estabelecido (62, 63). Nos casos que apresentam resultados negativos, quatro possíveis explicações têm sido sugeridas: (1) amostra insuficiente, (2) perda do gene L1 devido à integração, (3) baixa sensibilidade do método de detecção, e (4) existência de tipos de HPV ainda não identificados ou não detectáveis pelo método utilizado. A aplicação da metagenômica viral em lesões clínicas associadas ao HPV, que são aparentemente “HPV-negativo” é uma estratégia promissora na descoberta de novos HPVs patogênicos ou outros agentes virais associados à neoplasia (17).

### 2.1.3.2 Vírus Epstein-Barr (EBV)

O vírus Epstein-Barr identificado em células de Linfoma de Burkitt por Epstein et al. (1964), foi o primeiro vírus humano a ser implicado na carcinogênese dos tumores (64). De acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o vírus Epstein-Barr é classificado como carcinogênico para humanos do Grupo I. O papel etiológico do EBV no carcinoma de pênis tem sido foco de alguns estudos nos últimos anos (11, 13, 65, 66).

O EBV é um vírus da família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae*, também conhecido como Herpes vírus Humano tipo 4 (HHV-4), infecta aproximadamente 90% da população mundial, de acordo com dados soro epidemiológicos. Possui DNA linear fita dupla com cerca de 170 Kpb, envolvido por um capsídeo icosaédrico composto de 162 capsômeros e revestido por um envelope glicoproteico. O EBV apresenta dois subtipos virais: EBV-1 ou EBV-A predominante nas regiões ocidentais e EBV-2 ou EBV-B em regiões endêmicas da África (67). A transmissão do vírus ocorre, geralmente, pela saliva contaminada durante a infância. Após a infecção primária o vírus permanece no indivíduo por toda a vida. O EBV possui tropismo para linfócitos B e células epiteliais, podendo coexistir na forma latente e replicativa (ou lítica) (68-70).

Na forma latente (estado epissomal) são expressos alguns genes virais que codificam: seis proteínas reconhecidas como antígenos nucleares do EBV (*Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen*) EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B (ou EBNA-4), EBNA-3-C e LP (*Leader*

*Protein*) (ou EBNA-5); três proteínas latentes de membrana (*Latent Membrane Protein*) LMP-1, LMP-2A e LMP-2B; duas pequenas moléculas de RNA não poliadeniladas (*Epstein-Barr Virus Encoded small RNA*) EBER-1 e EBER-2; e transcritos da região BamHI A do genoma viral, BARH0 (*BamHI A Right-ward Open Reading Frame*) e BARF1(69, 71). A expressão inapropriada destes genes latentes, envolvidos na persistência celular, poderia contribuir para o desenvolvimento de tumores (12).

O envolvimento do EBV no câncer de pênis é controverso, em um estudo realizado por Lam et al.(1995)(65), cujo objetivo principal foi investigar a presença de EBV em 42 casos de carcinoma de pênis de pacientes chineses por hibridização *in situ*, o EBV foi encontrado em alguns linfócitos adjacentes do epitélio do carcinoma de pênis em 12% dos casos, não foi encontrado no tecido normal do pênis e nas verrugas e concluíram o não envolvimento do EBV no carcinoma de pênis. Entretanto, Alves et al. (2004) (11) realizaram um estudo com 21 amostras de CP e constataram que 95,5% foram identificadas com DNA de EBV e duas amostras positivas com expressão de LMP-1 por imunohistoquímica(12). Afonso et al. (2012) (13) em estudo com 135 amostras de carcinoma de pênis e demonstraram que 46,7% foram identificadas com DNA de EBV e 34,0% das amostras apresentam coinfeção para HPV e EBV.

O EBV é também considerado um vírus transmissível sexualmente e seu potencial oncogênico em associação ao HPV já foi proposto para câncer cervical (14) . A positividade do DNA viral do EBV foi observada em 51,0% de casos de câncer de pênis, sendo 29,0% dos casos de coinfeção com o HPV em estudo realizado por Afonso et al. (2017). Este dado sugere que o sinergismo entre o EBV e o HPV poderia contribuir para os eventos iniciais da carcinogênese do pênis, embora o significado destes achados requeira mais estudos (66).

A etiologia do câncer de pênis está distante de ser esclarecida. O papel individual ou sinergismo de vírus conhecidamente oncogênicos, tais como o HPV e o EBV no início dos eventos carcinogênicos ainda são bem discutidos. É relevante o desenvolvimento de estudos que demonstrem as vias de associação desses vírus no envolvimento da carcinogênese do pênis, bem como, estudos que viabilizem a identificação de vírus ainda não detectados nestes tumores.

#### **2.1.4 Mecanismos de Carcinogênese Peniana e resposta imune**

O mecanismo de carcinogênese peniana ainda não foi totalmente elucidado. O CP pode surgir da progressão de lesões precursoras relacionadas ou não a infecção pelo HPV (18, 50).

A carcinogênese peniana relacionada ao HPV, à infecção viral, inicialmente, é transitória, onde ocorre o desenvolvimento de uma lesão morfológica de baixo grau. No entanto, com a integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro, podendo ocorrer superexpressão de oncogenes que impulsionam a proliferação celular e a transformação maligna resultando no carcinoma invasor do pênis (49). A codificação dos oncogenes E6 e E7 pelo HPV é necessária para a transformação maligna e a manutenção do fenótipo maligno nas células hospedeiras. A expressão de oncoproteínas E6 e E7 levam a desordem nas vias p14<sup>ARF</sup>/MDM2/p53 e p16<sup>INKa</sup>/ciclina D/Rb interferindo no controle no ciclo de divisão celular e na apoptose (61).

Na carcinogênese peniana, independente do HPV, o processo estaria relacionado a lesões precursoras em áreas de irritação (locais de inflamação - lesão crônica) que progridem para lesões neoplásicas (18). Neste caso as células inflamatórias produzem espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) que estão envolvidas no desenvolvimento e progressão do câncer. A produção de citocinas, NF- $\kappa$ B, prostaglandinas, fator de crescimento angiogênico e ROS / RNS desempenham um papel crucial na carcinogênese. Bem como, a produção de O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estão envolvidos na regulação das vias de transdução de sinal e ativam os fatores NF- $\kappa$ B, AP-1 e p53 durante a apoptose, evitando a morte celular (72).

Todavia, tanto a carcinogênese relacionada ao HPV como a independente do HPV é iniciada por eventos em vias semelhantes no ciclo celular desencadeado por fatores distintos. Enquanto o primeiro usa a atividade de oncogenes virais para desordenar os genes supressores de tumores, este último resulta de alterações genéticas que levam ao bloqueio de vias de supressão de tumor (50).

No processo inflamatório crônico, não resolvido pela resposta imune, seria o ponto de partida inicial para o desenvolvimento e crescimento do câncer. Os linfócitos T CD4 Th1 e CD8, juntamente com a citocina IFN- $\gamma$ , compreendem a força primária das células imunes responsáveis pela inibição do crescimento e desenvolvimento do tumor, enquanto que os macrófagos associados ao tumor (TAM) ou as células supressoras derivadas de mieloides (MDSC) e suas citocinas IL-6, TNF, IL-1 $\beta$  e IL-23 podem desempenhar papéis importantes na promoção do crescimento e sobrevivência do câncer. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares que regulam positivamente e negativamente a função e o fenótipo das células é altamente complexa e grande parte permanecem desconhecidos (39).

Na resposta imune aos tumores, a vigilância imunológica ou imunoedição, as células tumorais são inicialmente eliminadas pelo sistema imunológico antes de se tornarem clinicamente detectáveis. Este estágio é seguido por uma fase de equilíbrio, as células podem

sofrer alterações genéticas que podem levar ao aumento da resistência imune e um processo de seleção para variantes tumorais menos imunogênicas e até que os tumores finalmente "escapem" ao ataque imunológico (73).

### 2.1.5 Diagnóstico, estadiamento e tratamento

O paciente apresenta como sintomas principais: lesão peniana, dor ou prurido, hemorragias, massas de virilha palpáveis e sintomas urinários. A glândula é o local mais comum, cerca da metade dos casos, seguido de prepúcio, e pode acometer a haste peniana e o escroto (31). A fimose pode dificultar o diagnóstico quando o câncer está escondido sob o prepúcio ou quando surge de dentro da uretra distal. A adenopatia inguinal palpável está frequentemente presente no diagnóstico, mas é geralmente de natureza inflamatória, devido à lesão peniana ulcerada ou infectada. Apenas metade dos pacientes com linfadenopatia palpável possui doença metastática, sendo o restante linfadenopatia inflamatória que se resolve após a ressecção do tumor primário e um curso de antibioticoterapia de 4-6 semanas (74, 75).

A despeito de o pênis ser um órgão externo, inspecionado várias vezes ao dia, ao longo da micção e palpado regularmente, é surpreendente que o diagnóstico, na maioria dos casos, é realizado em estágios avançados, cujo tratamento, muitas vezes mutilante, causa efeitos físicos e mentais devastadores aos pacientes (Figura 2) (76, 77).



**Figura 2.** Pacientes portadores de Câncer de pênis. Fonte: Arquivo pessoal.

A disseminação tumoral tem relação com as características histopatológicas da lesão primária e acontece predominantemente por via linfática para linfonodos inguinais, pélvicos e periórticos. De modo geral essas lesões pré-cancerosas envolvem alterações do epitélio

escamoso incluindo aumento da proliferação celular, perda de polaridade e desenvolvimento de atipias celulares de vários níveis (78).

O carcinoma de células escamosas do pênis (CCS) representa 95% dos tumores malignos do pênis. Outras neoplasias, como melanomas e sarcomas, são consideradas raras. Várias lesões penianas como leucoplasias, balanite xerótica obliterante, doença de Bowen, papulose Bowenóide e condiloma acuminado são consideradas como pré-malignas e estão diretamente associadas ao desenvolvimento do carcinoma invasor de pênis (28, 79, 80).

A classificação histológica dos tumores malignos do pênis foi baseada na morfologia celular, a partir de 2016, a Organização Mundial de Saúde (WHO) lançou uma nova classificação baseada na distinção clínica patológica e a relação com a infecção pelo HPV (Figura 3) (81). O carcinoma de células escamosas não relacionado à infecção pelo HPV apresenta histologia típica (ou subtipo usual). Carcinomas pseudo-hiperplásicos e carcinomas pseudoglandulares também não estão relacionados ao HPV. Outros subtipos de CCS não relacionadas ao HPV são: papilares, adenoescamosos e sarcomatoide - este com o pior prognóstico entre os carcinomas penianos. Dentre os carcinomas relacionados ao Papillomavirus humano podemos destacar o basalóide e *warty*. O CCS basalóide é considerado um tumor agressivo e apresenta alta taxa de metástase nodal, já o carcinoma *Warty* é raramente associado à metástase de linfonodos regionais (82).

CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DE PÊNIS - WHO			
Tumores epiteliais malignos		Tumores mesenquimais	
Carcinoma de células escamosas	8070/3	<i>Tumores benignos</i>	
Carcinoma de células escamosas Não-HPV-relacionado		Histiocitoma fibroso benigno	8030/0
Carcinoma de células escamosas, tipo usual	8070/3	Tumor Glômico	8711/0
Carcinoma Pseudo-hiperplásico	8075/3	Tumor de células granulares	9580/0
Carcinoma Pseudoglandular	8051/3	Hemangioma	9120/0
Carcinoma <i>Cuniculatum</i>		Xantogranuloma juvenil	
Carcinoma de células escamosas Papilífero, SOE	8052/3	Leiomioma	8890/0
Carcinoma adenoescamoso	8560/3	Linfangioma	9170/0
Carcinoma Sarcomatoide (spindle cell)	8074/3	Miointimoma	9137/0*
Carcinoma de células escamosas misto	8070/3	Neurofibroma	9540/0
		Schwannoma	9560/0
Carcinoma de células escamosas HPV-relacionado		<b>Tumores malignos ( incluindo tumores de potencial maligno incerto, marcados com*)</b>	
Carcinoma de células escamosas basaloide	8083/3	Angiossarcoma	9120/3
Carcinoma Basaloide, variante papilifera		Sarcoma de células claras	9044/3
Carcinoma <i>Warty</i>	8054/3*	Dermatofibrosarcoma <i>protuberans</i> *	8832/3
Carcinoma <i>Warty</i> (basaloide)		Hemangioendotelioma epitelióide	9133/3
Carcinoma de células claras	8084/3	Sarcoma epidermoide	8804/3
Carcinoma linfoepitelioma-like	8082/3	Sarcoma de Ewing	9364/3
Outros carcinomas raros		Fibroblastoma de células gigantes*	8834/1
<b>Lesões precursoras</b>		Sarcoma de Kaposi	9140/3
Neoplasia intraepitelial peniana	8077/2	Leiomiossarcoma	8890/3
Warty/basaloide/Warty-basaloide		Tumor maligno da bainha dos nervos periféricos	9540/3
Neoplasia intraepitelial peniana diferenciada	8077/2*	Mixofibrossarcoma	8811/3
Doença de Paget		Sarcoma pleomórfico indiferenciado	8802/3
		Osteossarcoma,	9180/3
<b>Lesões melanocíticas</b>		Rabdomiossarcoma	8900/3
		Sarcoma sinovial	9040/3
<b>Linfomas</b>		<b>Tumores metastáticos</b>	

Os códigos morfológicos são do Internacional Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (917-A). O comportamento é codificado: /0 para tumores benignos; /1 para tumores inespecíficos, limitrofe ou incerto; /2 para carcinoma *in situ* neoplasia epitelial de grau III e / 3 para tumores malignos. \* Novo código aprovado pelo IARC/WHO Committee for ICD-O.

**Figura 3.** Classificação dos tumores do pênis - Organização mundial da saúde. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (81).

O grau de diferenciação celular é um aspecto utilizado como fator preditivo de comprometimento dos linfonodos e de sobrevida (83). A definição do grau de diferenciação segue os critérios do WHO/ISUP (*International Society of Urological Pathology*), o qual é dividido nos seguintes níveis:

**Grau 1** - Carcinoma bem diferenciado;

**Grau 2** - Carcinoma moderadamente diferenciado;

**Grau 3** - Carcinoma pouco diferenciado;

O estadiamento tumoral serve para orientar o tratamento e fornece informações sobre o prognóstico do paciente. Dois sistemas de testes são usados no carcinoma peniano: sistema de estadiamento de tumor, nódulo e metástase (TNM) da *Union for International Cancer Control–American Joint Committee on Cancer* (UICC-AJCC) (83) e a classificação Jackson mais antiga,

porém ainda é utilizado na prática clínica (84). Uma descrição dos dois sistemas está no quadro 1.

A classificação de tumor, nódulo e metástase (TNM) patológica (pN) são baseadas na avaliação da biópsia ou da excisão cirúrgica, quadro 2.

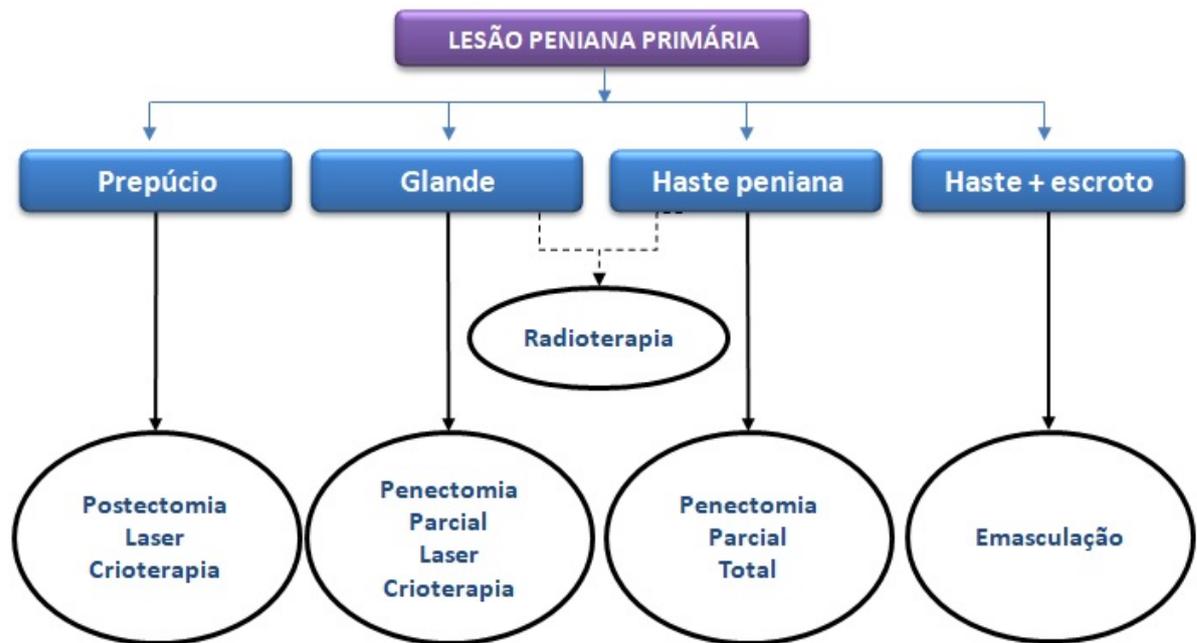
**Quadro 1-**Sistema de estadiamento TNM e Classificação de Jackson.

<b>TNM</b>	<b>Descrição</b>
T	Tumor primário
TX	O tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
Ta	Carcinoma verrugoso não invasivo
T1	Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial
T1a	Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial - Sem invasão linfovascular e bem ou moderadamente diferenciado (T1G1-2)
T1b	Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial - Com invasão linfovascular ou mal diferenciado / indiferenciado (T1G3-4)
T2	Tumor invade o corpo esponjoso/cavernoso
T3	Tumor invade a uretra
T4	Tumor invade outras estruturas adjacentes
N	Linfonodos Regionais
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
NO	Nenhum linfonodo inguinal palpável ou visivelmente aumentado
N1	Linfonodos inguinais unilateral palpável e móvel
N2	Múltiplos linfonodos unilaterais palpáveis ou bilaterais
N3	Massa nodal inguinal fixa ou linfadenopatia pélvica, unilateral ou bilateral
M	Metástase à distância
M0	Sem metástase à distância
M1	Com Metástase à distância
<b>Estágio</b>	<b>Classificação de Jackson</b>
I	Tumor limitado à glândula e/ou ao prepúcio
II	Tumor invade corpo cavernoso
III	Tumor com metástase(s) para linfonodo(s) inguinal(s)
IV	Tumor invade estrutura adjacente ou presença de linfonodos inoperáveis ou metástase(s) a distância.

**Quadro 2** -Sistema de estadiamento TNM classificação patológica.

<b>Classificação patológica</b>	<b>Descrição</b>
pN	Linfonodos regionais
pNX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
pN0	Não há metástase em linfonodos regionais
pN1	Metástase intranodal em um único linfonodo inguinal
pN2	Metástase em múltiplos linfonodos ou linfonodos inguinais bilaterais
pN3	Metástase em linfonodos pélvico, unilateral ou bilateral ou extensão extranodal das metástases linfonodais regionais
pM	Metástase à distância
pM0	Sem metástase à distância
pM1	Metástase à distância
<b>Grau</b>	<b>Gradação histológica</b>
GX	Grau ou diferenciação não pode ser avaliado
G1	Bem diferenciados
G2	Moderadamente diferenciados
G3-4	Pobremente diferenciados / indiferenciados

O tratamento do câncer de pênis deve ser individualizado, e dependente da extensão do tumor primário e da sua classificação, estabelecidas pela análise histopatológica a partir da biopsia da lesão (30, 80). A cirurgia deve ser o tratamento de escolha para carcinoma epidermóide do pênis. A cirurgia pela técnica Mohs pode ser uma opção de escolha para o tratamento de lesões de pequenas dimensões. A crioterapia e a ablação a laser são alternativas nos casos de pequenas lesões localizadas na glândula ou para pacientes que recusam tratamento cirúrgico. A penectomia parcial ou total torna-se necessária em tumores mais avançados (categoria T2 com invasão do corpo esponjoso/cavernoso). Para pacientes com evidência de metástase inguinal, a linfadenectomia é obrigatória. Em pacientes com doença localmente avançada (T4) é recomendada a quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia em pacientes elegíveis, Figura 4. A radioterapia e a quimioterapia não melhoram a sobrevida global, mas podem induzir uma remissão parcial (85). Estudos sobre a avaliação de estratégias de tratamentos que abrangem desde cirurgia padrão, quimioterapia neoadjuvante e quimioradioterapia, e o aumento da sobrevida do paciente estão em curso, com o objetivo de fornecer evidências para orientar a terapia para o câncer de pênis localmente avançado (86, 87).



**Figura 4.** Tratamento do câncer de pênis baseado na extensão do tumor primário. Esquema adaptado de Micali, Nasca et al. 2006 (80).

O entendimento da etiologia, patogênese e o prognóstico mais acurado dos tumores malignos de pênis são necessários, principalmente em regiões onde a doença não é rara. Pesquisas voltadas para estudos moleculares que investiguem as prováveis alterações epi/genéticas, agentes biológicos e clínicos associados ao desenvolvimento e a progressão dessa neoplasia vem surgindo nos últimos anos (88, 89).

## 2.2 Metagenômica e a perspectiva de novos patógenos em tecidos tumorais

Metagenômica é uma técnica de biologia molecular que permite a identificação de microrganismos na ausência de seu isolamento, este tipo de abordagem admite caracterizar todo o DNA ou RNA presente em uma amostra, permitindo a análise de todo o microbioma. Além disso, gradativamente, o genoma humano vem sendo sequenciado à medida que passamos para uma era da medicina genômica, no intuito de avaliarmos as interações desse microbioma e o surgimento das doenças (90).

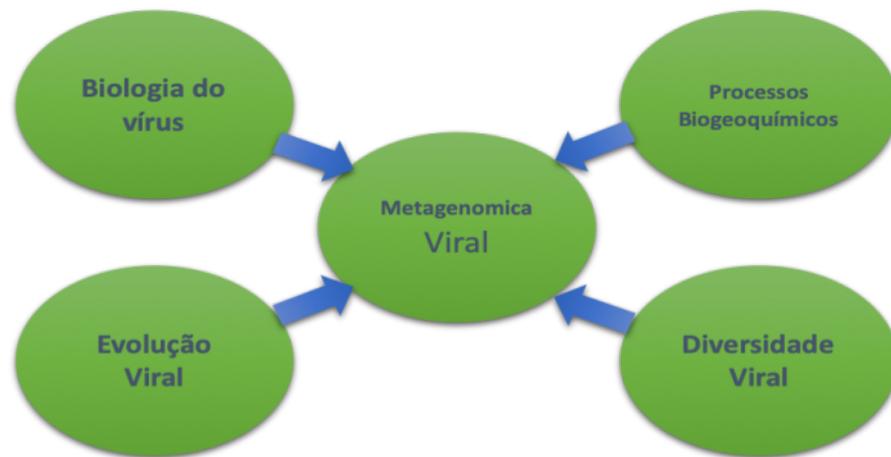
Tradicionalmente, técnicas de cultura tem sido o padrão ouro para a detecção de vírus por mais de um século. No entanto, uma grande maioria de vírus não é facilmente cultivável em cultura de células, limitando, assim, o nosso conhecimento sobre a biodiversidade destes organismos (91). Outra técnica largamente utilizada para a detecção de genes de origem viral em amostras biológicas é a metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR). Seja pelo

método convencional ou em tempo real, essa é uma técnica muito empregada, mas tem uma importante limitação. Por ser uma reação específica, utilizando iniciadores específicos ao DNA/RNA viral e, no caso do PCR em tempo real – com sondas - a reação é extremamente condicionada à detecção de um determinado organismo, ou a pequenos grupos filogeneticamente relacionados (92). Portanto, não é possível detectar na amostra nenhum organismo além do qual a técnica é direcionada. Dessa forma, vírus não identificados ou não previamente associados ao material biológico pesquisado, dificilmente são detectados.

Na pesquisa do câncer, a capacidade carcinogênica dos patógenos é bem reconhecida. A triagem de vírus e outros micro-organismos patogênicos, incluindo bactérias, fungos e parasitas, em tecidos de tumores humanos proporcionam uma melhor compreensão do papel destes patógenos na causa e na resposta terapêutica (93). Abordagens baseadas em novas tecnologias de sequenciamento estão sendo projetadas para executar essas tarefas através de um processamento rápido e econômico de grande número de amostras, apoiadas por análise de dados flexíveis com a opção de preparação de amostras para vários tipos de tecidos de pacientes (92, 94, 95).

Estudos de metagenômica apresentam ampla diversidade no campo de pesquisa científica, incluindo a investigação de informação genética sobre possíveis novos biocatalizadores ou enzimas; conexões genômica entre função e filogenia de organismos “não cultiváveis”; perfis evolutivos de função e estrutura de comunidades e novas hipóteses de funções microbiais (96, 97). A metagenômica aplicada à clínica inclui o diagnóstico de doenças, análise de microbiomas em estados doentes e saudáveis, caracterização da resposta do hospedeiro humano à infecção por transcriptômica e identificação de vírus associados a tumores e seus sítios de integração genômica (98).

As perspectivas futuras em virologia nos mostram que a metagenômica pode gerar uma infinidade de informações genéticas de vírus humanos desconhecidos e potencialmente infecciosos, alguns dos quais poderiam estar associados com doenças humanas (Figura 5) (17, 96, 97).



**Figura 5.** Potenciais adventos da análise metagenômica em virologia(96).

Em oncologia, a estratégia metagenômica modificou o modo de identificar e analisar a diversidade microbiana no tecido tumoral. Esta abordagem foi utilizada por Feng et al. (2008) (99) na descoberta de um novo vírus de políoma associado com a maioria dos casos de carcinoma de células de Merkel (MCC). O MCC é um câncer de pele humano raro e agressivo que normalmente afeta idosos e imunodeprimidos, com característica sugestiva de origem infecciosa. A presença de HPV numa variedade de lesões de pele pré-malignas e lesões benignas, além da identificação de diversos genótipos de HPV já descritos e dois novos genótipos (SE46 e SE47), foram reportados por Bzhalava, Johansson et al. 2013 (100). Demonstrando a viabilidade da técnica na identificação de novos patógenos envolvidos nos processos neoplásicos e não neoplásicos.

Um método utilizado no sequenciamento metagenômico de nova geração, conhecido como *Shotgun*, permite avaliar de forma imparcial todos os ácidos nucleicos microbianos e do hospedeiro presentes em uma amostra clínica. Geralmente, esta estratégia é utilizada para sequenciar todo o genoma. Entretanto, uma de suas limitações é a diminuição da sensibilidade com alto *background*, seja predominantemente do hospedeiro humano. Um passo de enriquecimento pode ser utilizado na tentativa de remover DNA de fundo humano residual, por exemplo, o tratamento com nucleases antes da extração (101).

Uma grande proporção de leituras de sequência dos conjuntos de dados de sequenciamento de genoma inteiro do tumor é de origem humana. Sendo assim, estudos de metagenoma viral, a própria biologia do vírus impõe considerações durante o processo de planejamento, construção e análise. É importante ressaltar que o dado metagenômico não é um substituto para as tecnologias atuais, mas um ponto de partida para estudo ecológico futuro (93, 96).

No processo carcinogênico, os microrganismos são responsáveis por uma porcentagem significativa, portanto, o estudo metagenômico de neoplasias, despontam como uma ferramenta promissora na investigação de patógenos prováveis causadores de câncer. A descoberta destes agentes pode melhorar medidas de prevenção e tratamento, bem como, expandir as pesquisas nesta área do conhecimento.

### 3. JUSTIFICATIVA

O câncer de pênis é uma entidade devastadora para o homem, e ao contrário do que ocorre nos países desenvolvidos, no Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o tumor representa 2% de todos os casos de câncer no homem, sendo mais frequente nas regiões Norte e Nordeste.

O caráter mutilante do tratamento cirúrgico, afeta aspectos físicos e psicológicos do paciente. Dessa forma, para se obter uma redução da sua ocorrência é de suma importância a pesquisa sobre suas causas e fatores de risco, uma vez que o diagnóstico precoce é fundamental para seu controle e erradicação.

As causas do câncer de pênis são multifatoriais, embora ainda não tenha sido encontrado um carcinógeno específico, alguns fatores de risco estão bem definidos, como: fimose, infecção por HPV, uso de tabaco, zoofilia, Líquen escleroso, idade e história de fotoquimioterapia. Entretanto, dados ainda não publicados do estudo que está em andamento na Fcecon, “Caracterização epidemiológica e clínica dos pacientes portadores de carcinoma de células escamosas do pênis e associação com a infecção pelo Papillomavirus Humano“ mostram que 38% dos pacientes com CP não apresentam infecção por HPV e/ou EBV, e 19% dos pacientes não apresentavam nenhum dos fatores de riscos descritos.

O conhecimento sobre a diversidade viral nas amostras tumorais de pênis pode ter grande impacto no delineamento de estratégias na prevenção e tratamento desta neoplasia. A utilização de metodologia de nova geração de sequenciamento metagenômico, onde se busca o viroma presente no carcinoma de pênis, pode ser uma estratégia na identificação de vírus conhecidos ou desconhecidos.

Dada à necessidade de dados cientificamente sólidos no conhecimento do CP e, principalmente, pela importância que esta neoplasia tem no Brasil e na região amazônica, o presente projeto buscou identificar e descrever a população viral em tecido tumoral de pênis e sua correlação com esses tumores. Estes dados poderão contribuir para futuros estudos que investigarão a influência desta variação microbiológica na carcinogênese do tumor de pênis e suas prováveis alterações genéticas e clínicas associadas ao desenvolvimento e a progressão desta neoplasia.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Descrever as características sociodemográficas, comportamentais, clínicas de pacientes portadores de câncer de pênis, bem como, a caracterização do viroma destes tumores.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar o perfil socioeconômico e comportamental dos pacientes incluídos no estudo para estabelecimento de prováveis fatores de riscos;
2. Descrever a classificação histopatológica e marcação imunohistoquímica para p16<sup>INK4a</sup> e o perfil clínico dos pacientes;
3. Caracterizar o viroma em amostras teciduais de tumores de pênis;
4. Correlacionar a composição do viroma com o perfil socioeconômico, comportamental e variáveis clínicas apresentadas pelos pacientes.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo observacional descritivo das características sociodemográficas, comportamentais, clínicas e o viroma de pacientes com câncer de pênis atendidos na Fundação Centro de Controle de oncologia do Estado do Amazonas

Este projeto é um desdobramento de estudo anterior do mesmo grupo de pesquisa intitulado "Caracterização epidemiológica e clínica dos pacientes portadores de carcinoma de células escamosas do pênis e associação com a infecção pelo Papillomavirus Humano" que teve início com coleta de amostras em agosto de 2013 e obteve aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em 07/12/2011 CAAE N° 0516.0.115.000-11 (Anexo 10.1). Portanto, envolveu amostras coletadas desde agosto de 2013 cujas amostras teciduais estavam viáveis para realização dos ensaios previstos neste estudo.

Atendendo à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, o projeto “Análise metagenômica do viroma das neoplasias penianas” incluía novos objetivos a pesquisa e, portanto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON com protocolo CAAE N° 70834117.0.0000.0004– parecer de aprovação 2.230.007 em 21 de Agosto de 2017 (Anexo 10.2).E, cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) - Número do Cadastro: A5F36C5

Foi realizada análise retrospectiva e prospectiva do material obtido por procedimento cirúrgico de penectomia parcial ou total de CP de pacientes atendidos no ambulatório de urologia da FCECON no período de agosto de 2013 a dezembro de 2018.

### **5.2 População de estudo**

Foram incluídos no estudo pacientes portadores de câncer de pênis, mediante o consentimento prévio, atendidos no ambulatório de Urologia da FCECON entre o período de agosto de 2013 e dezembro de 2018 com indicação de procedimento cirúrgico de penectomia parcial ou total.

### **5.3 Local de Estudo**

O estudo foi desenvolvido na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON, no serviço de Urologia desta instituição.

A FCECON é uma unidade de saúde terciária, localizado na cidade de Manaus-Amazonas, Brasil. É uma instituição de referência em oncologia, tendo por objetivo promover a prevenção, o diagnóstico e o tratamento do câncer.

#### **5.4 Cálculo amostral**

Os pacientes participantes da pesquisa foram selecionados a partir da demanda espontânea da Gerência de Urologia da FCECON no período de agosto de 2013 a dezembro de 2018.

De acordo com os registros do serviço de urologia da FCECON são registrados por ano cerca de 12 novos casos de câncer de pênis. Neste estudo, se propôs a investigar os casos de câncer de pênis tratados cirurgicamente (80% dos casos) e foi considerada uma perda de 10%. Assim, estimou-se uma frequência de 48 casos.

Durante o recrutamento de participantes no estudo foram incluídos 47 pacientes. E, a partir da triagem para vírus potencialmente oncogênicos, 13 amostras negativas para HPV e EBV, nos métodos de análises utilizados, seguiram no estudo de viroma. Uma amostra positiva para HPV e EBV foi incluída como controle.

#### **5.5 Critérios de elegibilidade**

##### **5.5.1 Critério de inclusão**

- ✓ Pacientes com idade superior a 18 anos;
- ✓ Com diagnóstico histopatológico confirmado de câncer de pênis;
- ✓ Com indicação de tratamento cirúrgico (penectomia parcial ou total);
- ✓ Diagnóstico molecular para HPV negativo (Fase de triagem das amostras);
- ✓ Diagnóstico molecular para EBV negativo (Fase de triagem das amostras);

##### **5.5.2 Critério de exclusão**

- ✓ Pacientes portadores de outras doenças urológicas neoplásicas.

## **5.6 Materiais e Métodos**

### **5.6.1 Procedimentos de abordagem ao paciente com câncer de pênis, coleta de dados clínicos e epidemiológicos.**

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão, durante a consulta de rotina (antes do procedimento cirúrgico), foram abordados no ambulatório de urologia da FCECON, onde foram orientados sobre o estudo e seus objetivos, bem como, convidados a participar do mesmo. Ao concordarem com os termos do estudo, foram orientados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Apêndice 11.1).

Através do uso de um questionário padrão (Apêndice 11.2), foram coletadas informações epidemiológicas sobre os fatores de risco e os determinantes sociais de saúde relacionados ao câncer de pênis. Além disso, com o uso do mesmo formulário foram coletados dados clínicos e as características da lesão obtidos durante o acompanhamento do paciente na consulta médica, por um dos membros da equipe ou mesmo pela busca de informações nos prontuários dos pacientes.

### **5.6.2 Procedimentos de coleta e conservação de amostra biológica**

A coleta da amostra ocorreu tão somente mediante a indicação de intervenção cirúrgica (penectomia total ou parcial), dado a evolução clínica do paciente, e conforme a decisão conjunta tanto do médico quanto do paciente.

No centro cirúrgico, durante o ato cirúrgico foi realizada a coleta de parte da lesão, realizada pela equipe de urologistas. Foram retirados três fragmentos da lesão tumoral de 3-5 mm do tecido tumoral (50-150mg). O material coletado foi armazenado imediatamente em microtubos de 2,0mL livres de DNase e RNase e congelados a -30°C e armazenado no laboratório de biologia molecular da FCECON até o momento da extração do DNA. No momento das análises, as amostras foram descongeladas e realizado o processo de extração de DNA utilizando kits comerciais. As técnicas moleculares de pesquisa do DNA do vírus EBV, HPV e genotipagem do mesmo, foram realizadas em parceria com os Laboratórios de Virologia da Fundação de Medicina Tropical- Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Laboratório de Biologia Molecular da Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta (FUAM) e do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-USP).

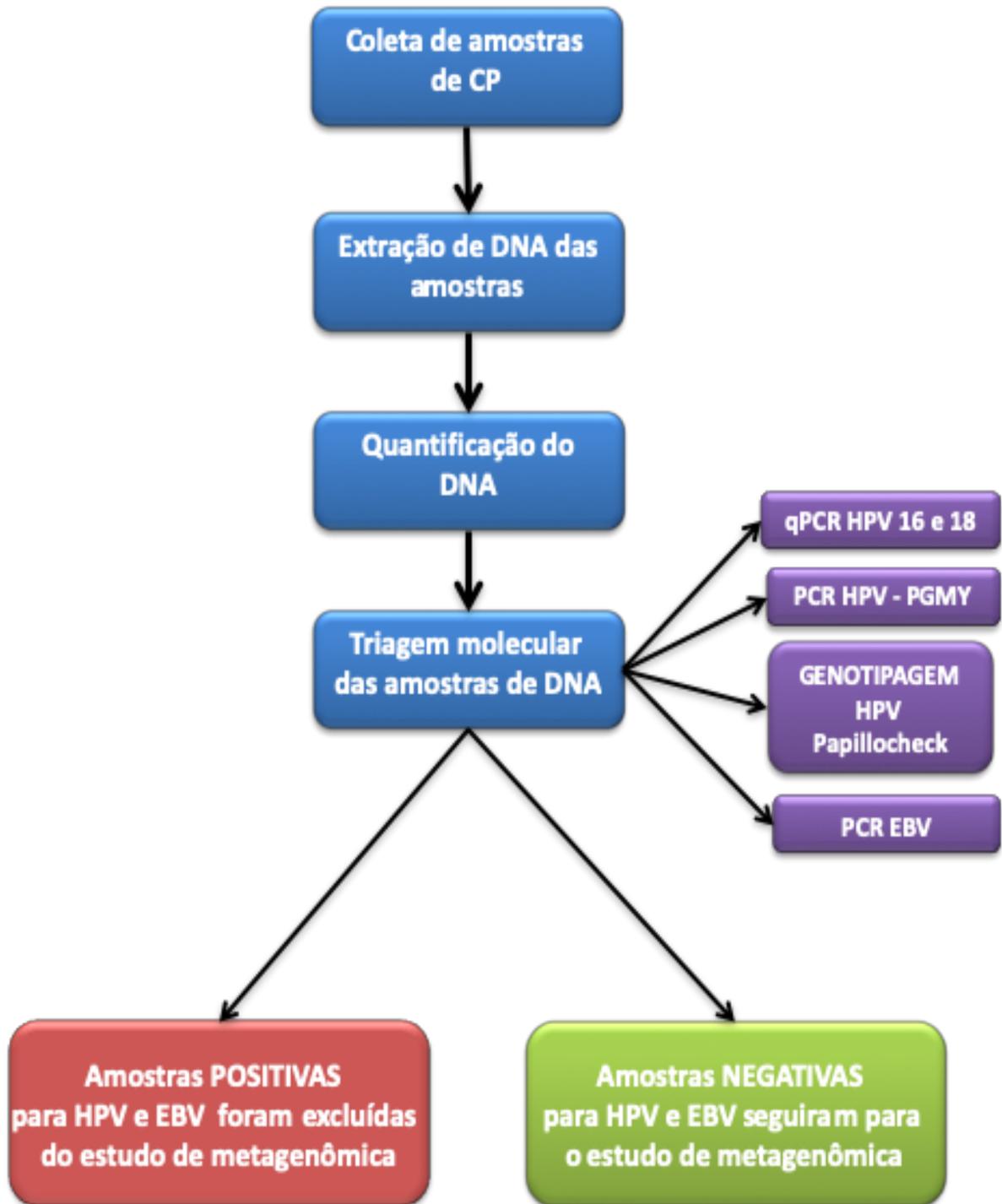
A estratégia metodológica adotada para a seleção dos pacientes e coleta das amostras pode ser visualizada na Figura 6.



**Figura 6.** Seleção dos pacientes e coleta das amostras de câncer de pênis (CP).

### 5.6.3 Procedimentos de triagem laboratorial para vírus oncogênicos

Para a caracterização do viroma presente em amostras de CP, primeiramente, foi realizado a triagem laboratorial para vírus oncogênicos - HPV e EBV. A estratégia diagnóstica utilizada está ilustrada na Figura 7. Somente seguiram no estudo de metagenômica as amostras que não foram identificadas com a presença de HPV e EBV.



**Figura 7.** Fluxo de diagnóstico laboratorial das amostras de câncer de pênis.

### 5.6.3.1 Protocolo de extração dos ácidos nucleicos

Extração para triagem viral - O DNA amostral foi extraído a partir de 25mg de tecido fresco, utilizando o DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN Inc., USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O volume final obtido de 200 µl.

### 5.6.3.2 Quantificação do DNA extraído

A quantificação de DNA na amostra extraída foi realizada por espectrofotometria através do equipamento NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Scientific™ São Paulo, Brasil). De acordo com as recomendações técnicas.

### 5.6.3.3 Protocolo de controle endógeno da reação em cadeia da polimerase

A detecção do gene da  $\beta$ -globina foi amplificada por reação em cadeia da polimerase para avaliar a integridade do DNA extraído, a fim de evitar os resultados falsos negativos. As sequências de  $\beta$ -globina humana foram GH20: (5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC'3) e PCO4: (5'CAACTTCATCCACGTTACC'3) (Life Technologies, São Paulo, Brasil), (102).

### 5.6.3.4 Protocolo de detecção e genotipagem de Papillomavirus humano

Para a detecção e genotipagem do HPV foram realizadas em etapas com o intuito de minimizar os custos dos protocolos de genotipagem. As mesmas estão descritas a seguir:

**Etapa I**—Todas as amostras foram testadas em uma reação de PCR convencional com os iniciadores PGMY09/11 genéricos (Life Technologies, São Paulo, Brasil) (quadro 3), que amplificam um fragmento de 450 pb abrangendo a região L1 da maioria dos tipos de HPV de mucosa, de acordo com o protocolo seguinte:

**PCR HPV - PGMY09/11**

Componentes	Vol.( $\mu$ l) 1 Reação	Concentração Final	
H <sub>2</sub> O	14,5		
PCR buffer 10x (sem MgCl <sub>2</sub> )	2,5	1	X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,8	1,6	mM
dNTP (10 mM)	0,5	0,2	mM
Primer PGMY 09/11 (10 $\mu$ M)	0,5	0,2	$\mu$ M
Primer PCO4 (10 $\mu$ M)	0,5	0,2	$\mu$ M
Primer GH20 (10 $\mu$ M)	0,5	0,2	$\mu$ M
Taq Platinum 5U/ $\mu$ l	0,2		
DNA	5		
total	25		

O protocolo da reação de PCR no termociclador teve início a partir de desnaturação inicial a 95°C durante 5min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 60s, hibridização a 55°C durante 60s, extensão a 72°C durante 60s e extensão final a 72°C durante 10min, a cada corrida foram incluídos os seguintes componentes de controles: DNA de células HeLa como controle positivo e água RNase e DNase-free como branco da reação. A linhagem celular HeLa (10-20 cópias HPV 18 integrados por célula) e a linhagem celular SiHa (1-2 cópias de HPV 16 integrados por célula) foram recebidas como cortesia do Dr. José Eduardo Levi, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

**Etapa II**– No intuito de identificar os genótipos mais prevalentes HPV16 e HPV18, foi utilizado o protocolo segundo VEO et al. (2015) (103), no qual as amostras foram submetidas a ensaio de *real-time* PCR(qPCR) tipo específico, tendo como alvo a proteína E7 dos HPV16 e 18. Os ensaios de qPCR foram processados em sistema ABI 7300 de PCR em tempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Os ensaios de *real-time* PCR (qPCR) para a proteína E7 do HPV 16 incluíram os seguintes *primers* de oligonucleotídeos: *primer forward* (5’GAT GAA ATA GAT GGT CCA GC3’) e *primer reverse* (5’GCT TTG TAC GCA CAA CCG AAG C3’), e a sonda (5’ FAM-CAA GCA GAA CCG GAC AG-MGB-NFQ) (Life Technologies, São Paulo, Brasil), de acordo com o protocolo seguinte:

**qPCR HPV16**

Componentes	Vol.(µl) 1 Reação	Concentração Final	
H <sub>2</sub> O	5		
TaqMan Master Mix 2x	12,5	1	X
P HPV 16 E7 (10 µM)	1,0	0,4	µM
P HPV 16 E7S (10 µM)	1,0	0,4	µM
Probe HPV 16 (10 µM)	0,5	0,2	µM
DNA	5		
Total	25		

As condições de amplificação foram de 50 °C por 2m e 95 °C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15s, 55 °C por 1min e 60 °C por 1min. A reação de qPCR foi processada

no equipamento ABI 7300, a cada corrida foram incluídos os seguintes componentes de controles: DNA de células SiHa como controle positivo e água RNase e DNase-free como branco da reação; juntamente com as amostras em duplicata.

Os ensaios de qPCR para a proteína E7 do HPV 18 incluíram os seguintes *primers* de oligonucleotídeos: *primer forward* (5' AA GAA AAC GAT GAA ATA GAT GGA 3') e *primer reverse* (5' GGC TTC CAC CTT ACA ACA CA 3'), e a sonda (5' VIC-AAT CAT CAA CAT TTA CCA GCC-MGBNFQ 3') (Life Technologies, São Paulo, Brasil), de acordo com o protocolo seguinte:

#### qPCR HPV18

Componentes	Vol.( $\mu$ l) 1 Reação	Concentração Final	
H <sub>2</sub> O	4,5		
TaqMan Master Mix 2x	12,5	1	X
P HPV 18 E7 (10 $\mu$ M)	1,0	0,4	$\mu$ M
P HPV 18 E7S (10 $\mu$ M)	1,0	0,4	$\mu$ M
Probe HPV 18 (10 $\mu$ M)	1,0	0,4	$\mu$ M
DNA	5		
Total	25		

As condições de amplificação foram de 50°C por 2min e 95°C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s, 50°C por 1min e 60°C por 1min. A reação de qPCR foi processada no equipamento ABI 7300, a cada corrida foram incluídos os seguintes componentes de controles: DNA de células HeLa como controle positivo e água RNase e DNase-free como branco da reação; juntamente com as amostras em duplicata.

**Quadro 3-** Sequência do *primer* PGMY09/11

Primer	Sequência(5' – 3')
PGMY 11 - A	..... GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY 11 - B	..... GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY 11 - C	..... GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY 11 - D	..... GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY 11 - E	..... GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09 - F	..... CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09 - G	..... CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09- H	..... CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09 - I	..... G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09 - J	..... CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09 - K	..... CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09 - L	..... CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09 - M	..... CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09 - N	..... CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09 - P	..... G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09 - Q	..... CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09 - R	..... CGT CCT AAA GGA AAA TGG TC
HMB01	..... GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT

Fonte: adaptado de(104)

### **Etapa III - Genotipagem do HPV pelo PapilloCheck® HPV-Screening**

Para determinar os genótipos de HPV presentes nas amostras positivas por reação de PCR convencional com os iniciadores PGMY09/11 genéricos e negativas no ensaio de *real-time* PCR (qPCR) tipo específico, foi utilizado o kit comercial PapilloCheck® HPV-Screening (Greiner Bio-One, Germany), o teste é baseado na tecnologia de “microarray” para a detecção e genotipagem de um fragmento do gene E1 do genoma do HPV (105).

O ensaio é dividido em quatro etapas: PCR, hibridização, lavagem e escaneamento. A primeira etapa, reação de PCR foi composta por 5µl do DNA extraído, 19,8 µl de solução contida no PapilloCheck® Master Mix, 1U de HotStart Taq DNA Polymerase (Qiagen, Germany) e 0,005U de UNG (Uracil N-DNA Glycosylase) (Fermentas, Germany) para perfazer um volume final de 26 µl.

A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, USA), segundo o protocolo: 37°C por 20min para a ação da UNG, 95°C por 15min, seguido de 40 ciclos de (95°C por 30s e 72°C por 45s).

Os produtos PCR são então hibridizados para sondas DNA específicas e controles “*on-chip*” ligados à superfície do chip PapilloCheck®. Durante a hibridização, o DNA ligado é marcado por fluorescência e o DNA não ligado é removido nas etapas de lavagem subsequentes. Em seguida, o “chip” PapilloCheck® é scaneado, analisado e avaliado automaticamente usando o Check Scanner TM e Check Report TM Software, respectivamente.

O Check Scanner TM é um scanner a laser bicolor (comprimento de onda de excitação 532nm e 635nm) que possibilita a detecção do sinal de fluorescência gerado pela presença do produto de amplificação específico de HPV bem como os controles. O Check Report TM Software possibilita a visualização, análise e avaliação dos resultados e apresenta automaticamente os valores correspondentes tanto dos tipos de HPV detectados como dos controles em um relatório detalhado.

O resultado é avaliado e emitido automaticamente pelo Check Report TM e indica a presença ou ausência de um ou mais dos 24 tipos de HPV detectáveis, (Figura 8).

HPV 16	HPV 45	HPV 59	HPV 6
HPV 18	HPV 51	HPV 66	HPV 11
HPV 31	HPV 52	HPV 68	HPV 40
HPV 33	HPV 53	HPV 70	HPV 42
HPV 35	HPV 56	HPV 73	HPV 43
HPV 39	HPV 58	HPV 82	HPV 44 / HPV 55*

\* PapilloCheck® não permite a diferenciação entre o HPV 44 e o HPV 55.

**Figura 8.** Genótipos de HPV detectáveis com o PapilloCheck®

### 5.6.3.5 Protocolo de detecção de vírus de Epstein – Barr

Para a detecção do vírus de Epstein – Barr nas amostras de CPf oi utilizado o protocolo, com uma reação de PCR gênero-específico produzindo amplicons de 182 pb, de acordo com Markoulatos, et al. (2001) (106).

#### PCR EBV

Componentes	Vol.(µl) 1 Reação	Concentração Final	
H <sub>2</sub> O	15,3		
PCR buffer 10x (sem MgCl <sub>2</sub> )	2,5	1	X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5	1,5	mM
dNTP (10 mM)	1,0	0,4	mM
EM3/EP5(10 µM)	0,75	0,3	µM
Bct S/S (10 µM)	0,75	0,3	µM
Taq Platinum 5U/µl	0,2		
DNA	3		
Total	25		

O protocolo da reação de PCR no termociclador teve início a partir de desnaturação inicial a 95°C durante 5min, seguido por 10 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30s, hibridização a 63°C durante 60s, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30s, hibridização a 60°C durante 30s, extensão a 72°C durante 30s e extensão final a 72°C durante 10min, a cada corrida foram incluídos os seguintes componentes de controles: Amostra conhecidamente positiva (controle positivo) e água RNase e DNase-free como branco da reação.

### 5.6.3.6 Eletroforese

Todos os *amplicons* foram analisados por eletroforese, em gel de agarose (LW Biotec) e a concentração do gel foi de acordo com o tamanho do *amplicon* que se desejava avaliar (1,5-1,8%). Para tanto, uma alíquota de 5,0µl do produto amplificado na reação de PCR foi adicionado a 2,0µl de solução tampão de amostra (0,5% azul de bromo fenol e 20% de glicerol), corado com SYBR™ Green (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil), aplicado no gel submerso em cuba horizontal de eletroforese, com solução tampão TBE 1X (89mM Tris; 89mM

Ácido Bórico; 2mM EDTA), pH 8,4 (Fermentas lifesciences, Luthuania), sobtensão elétrica de 100 Volts, aproximadamente por 70 minutos.

As bandas foram visualizadas sob a luz ultravioleta (UV) em uma câmara escura, equipada com transiluminador e a imagem foi registrada através de câmara fotográfica digital.

O tamanho dos amplicons foi determinado em comparação com o marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas lifesciences, Luthuania).

### **5.7 Sequenciamento de nova geração – NGS**

Amostras negativas para HPV e EBV seguiram para a análise por sequenciamento em larga escala. O protocolo de metagenômica viral selecionado para este estudo foi *Novel Enrichment Technique of Viromes* (NetoVIR) descrito por Conceição-Neto et al. (2015)(107). Adaptado para tecido tumoral pelo protocolo de Kohl et al. (2015)(108). O protocolo utilizado no estudo foi baseado nas seguintes etapas: homogeneização do tecido tumoral; enriquecimento de partículas virais extracelulares por centrifugação e filtração; tratamento com nucleases antes da extração dos ácidos nucleicos (DNA e RNA); extração dos ácidos nucleicos (DNA e RNA); amplificação; preparação da biblioteca e sequenciamento das amostras. Uma amostra conhecidamente positiva para HPV 16 e EBV foi incluída no estudo do viroma como controle positivo. Esta amostra foi validada por PCR em todas as etapas, metodologia já descrita na triagem para vírus oncogênicos. O fluxo com as etapas de análises pode ser visualizado na Figura 9, as mesmas estão descritas a seguir.

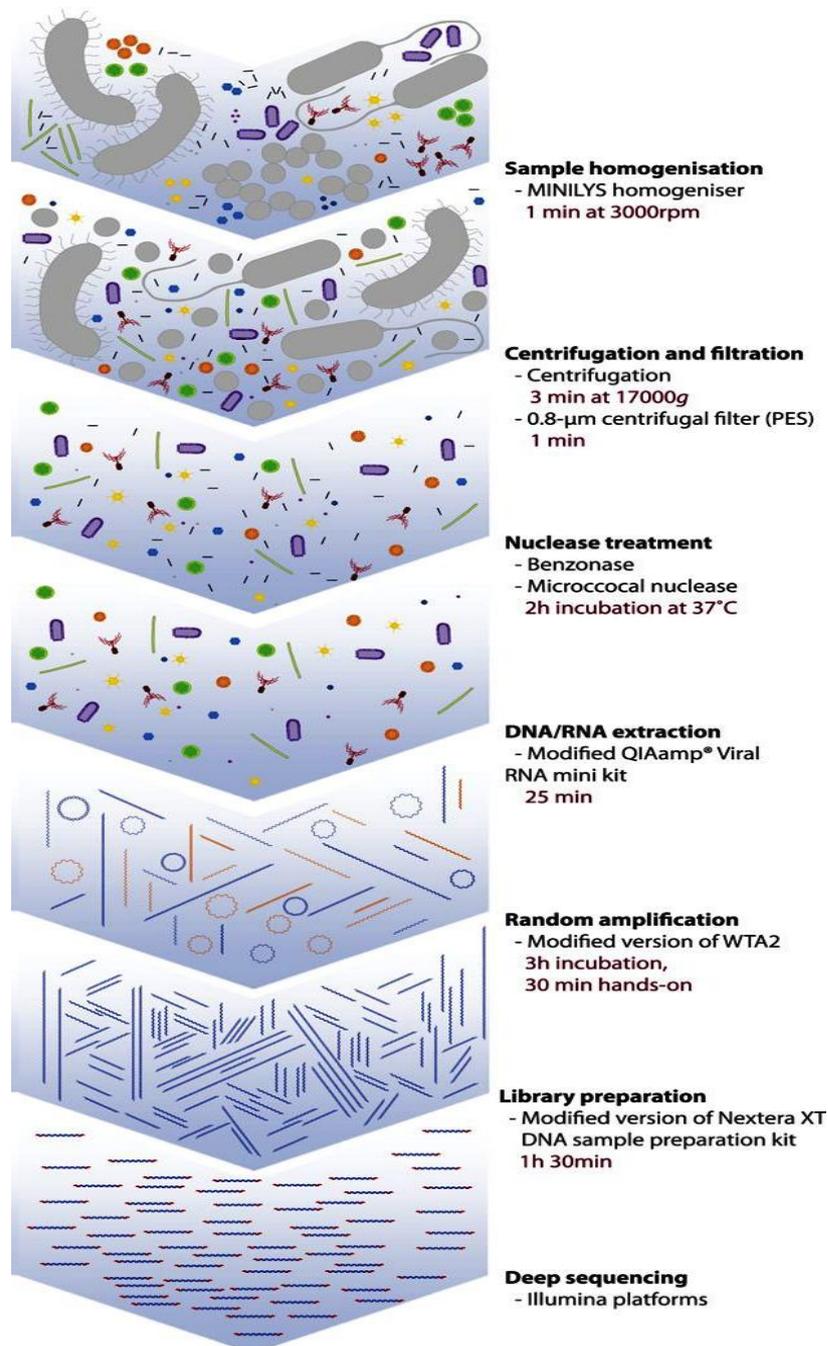
#### **5.7.1 Homogeneização do tecido tumoral**

Esta primeira etapa foi realizada de acordo com o protocolo de Kohl 2015. Em um cadinho com auxílio de um bisturi e pinça descartável as amostras de tecido tumoral - validada pela patologia (massa de 50-150mg) - foram cortadas para obtenção da amostra de análise. A homogeneização foi realizada em tubos contendo esferas cerâmicas(2,8 mm), que permitem uma dissociação mecânica do tecido quando o tubo é agitado no equipamento Precellys. Foi adicionado 1 ml de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) estéril aos tubos com as amostras, que foram agitados no Precellys a 6.500 rpm por 4 vezes durante 15 sec.

#### **5.7.2 Enriquecimento de partículas virais**

Após a homogeneização, foi realizada uma centrifugação a 17.000g durante 3min para precipitar as células hospedeiras humanas e partículas que forem maiores. Todo o sobrenadante

foi recuperado e 500µl foi filtrado a 2.000g de 2 a 10min em filtro de 0,8µm, para eliminar bactérias. Para a digestão de ácidos nucleicos livres (fora das partículas virais) foi realizado um tratamento com nucleases, a 130µl do filtrado foi adicionado 8,4µl do Tampão 20X (Tris 1M, CaCl<sub>2</sub> 100mM e MgCl<sub>2</sub> 30mM), 1µl de micrococcal nuclease e 2µl de benzonase nuclease, thermomixer a 37°C durante 2h. Para término da reação enzimática foi adicionado 7µl de *Ethylenediamine tetra acetic acid* (EDTA) 0,2M(Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).



**Figura 9.** Esquema de análise de metagenômica viral. Protocolo adaptado de Nádía Conceição-Neto et al. (2015) (107).

### 5.7.3 Extração e quantificação de DNA/RNA

Para extração de DNA/RNA foi utilizado o QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O volume final obtido de 60 µl. Os DNA/RNA eluídos foram quantificados por fluorimetria, com os kits Qubit RNA HS Assay Kit e Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher, EUA).

### 5.7.4 Amplificação do DNA/RNA

A amplificação do DNA/RNA é fundamental para adquirirmos material suficiente para o sequenciamento. Foi utilizado o kit Complete Whole Transcriptome Amplification Kit WTA2 (Sigma-Aldrich), que se baseia na transcrição reversa de RNA para cDNA utilizando oligos randômicos contendo uma sequência universal que é utilizada subsequentemente para amplificação por PCR. 0,5µl de Library Synthesis Solution foram adicionados a 2,82µl da amostra extraída (5-25ng de RNA), incubada no termociclador por 2min a 95°C. Em seguida, adicionado 0,5µl de Library Synthesis Buffer, 0,78µl de água RNase e DNase-free e 0,4µl de Library Synthesis Enzyme, incubada no termociclador (18°C por 10 min, 25°C por 10min, 37°C por 30min, 42°C por 10min, 70°C por 20min e resfriando até 4°C). A esses 5µl de biblioteca foi adicionado 7,5µl de Amplification Mix, 60,2µl de água RNase e DNase-free, 1,58µl de WTA dDNTTP mix, 0,75µl de Amplification enzyme, seguido de incubação no termociclador (94°C por 2 min, seguido por 20 ciclos de 94°C por 30s, e 70°C por 5min, e resfriando até 4°C).

Para a purificação das amostras amplificadas foi utilizado o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, EUA). Foi adicionado 375µl de Buffer PB aos 75µl de produto amplificado, transferido para a coluna QIAquick, e centrifugado por 17.900g por 1min. O eluato foi então descartado e a coluna lavada com 750µl de Buffer PE. O DNA foi eluído da coluna com 50µl de água RNase e DNase-free. A quantificação do DNA na amostra foi realizada com fluorímetro Qubit (Thermo Fisher, EUA).

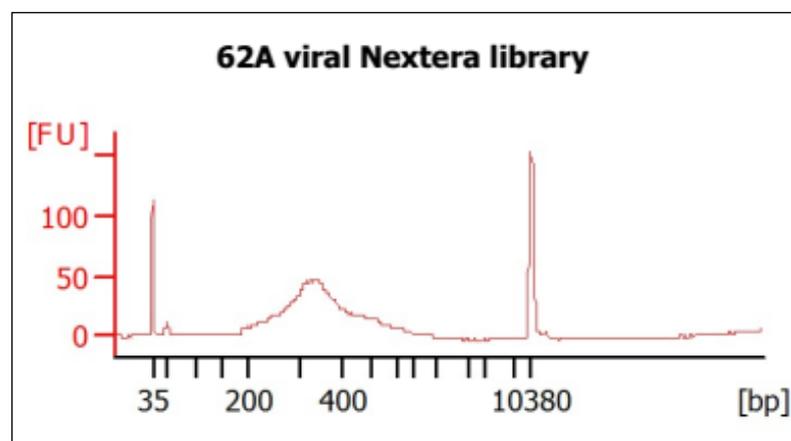
### 5.7.5 Preparo da biblioteca

Para a construção da biblioteca foi utilizado 3ng do DNA amplificado com Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, EUA). Foi preparado um mix contendo 5µl de Tagment Buffer, 2,5µl de Amplicon Tagment Mix e 2,5µl de DNA amplificado (diluído para 1,2ng/µl). Essa reação foi incubada no *Hybex Microsample Incubator* (SciGene) a 55°C por 4min, para o processo de tagmentação. Para suspender o processo foi adicionado 2,5µl de Neutralize Tagment Buffer. Foram adicionados então os componentes: 2,5µl de primer 1 (i7, N70X diferente para cada amostra) 2,5µl de primer 2 (i5, S50X diferente para cada amostra) e 7,5µl

de Nextera PCR master mix. Em seguida a reação foi incubada no termociclador - 72°C por 3min, 15 ciclos de 95°C por 30s, seguido por 15 ciclos de 95°C por 10s, 55°C por 30s, 72°C por 45s e resfriando até 4°C.

As bibliotecas foram purificadas com AMPure *magnetic beads*. Foi adicionado 15µl das esferas magnéticas a 25 µl de produto de PCR, que foi incubado a temperatura ambiente por 5min e posicionado no suporte magnético por 2min para ligação das esferas ao imã. O sobrenadante foi removido e as esferas foram lavadas utilizando 200 µl de etanol 80%. O etanol foi removido e as bibliotecas foram eluídas das esferas utilizando 26,25 µl de Resuspension Buffer. Após ligação das esferas ao imã, 25 µl do sobrenadante (contendo as bibliotecas purificadas) foi transferido para novos tubos. A concentração das bibliotecas foi determinada pelo Qubit (Thermo Fisher, EUA) e a distribuição de tamanhos dos fragmentos de DNA foi determinada pelo Bioanalyzer (~ 250-1000 bp) (Agilent, EUA), um exemplo de análise da amostra 62A pode ser visualizado na Figura 10.

As bibliotecas foram quantificadas por qPCR com o KAPA Library Quantification Kit (Illumina, EUA). Diluições de 1:500 e 1:5000 das bibliotecas foram preparadas para que fiquem dentro da curva padrão fornecida no Kit. Foi adicionado a 4µl de amostra diluída 6µl de uma mistura de 2X KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix/10X Primer Premix/ROX High. O qPCR foi realizado no equipamento StepOne Plus (Thermo Fisher, EUA) com o programa: 95°C por 5min, seguido por 35 ciclos de 95°C 30s e 60°C por 45s. Cada biblioteca foi diluída para uma concentração de 4nM, utilizando a concentração obtida no qPCR e o tamanho médio obtido no Bioanalyzer, uma mistura equimolar das bibliotecas foi então preparada para o sequenciamento.



**Figura 10.** Biblioteca da amostra 62 A do estudo de metagenômica viral. Distribuição de tamanho (250–1000 bp).

### 5.7.6 Sequenciamento das amostras

O sequenciamento foi realizado na plataforma NextSeq 500 (Illumina, EUA) com leitura paired-end 150bp, utilizando o High-output flow cell, com capacidade esperada de gerar até 400 milhões de sequências. Com essa quantidade de sequências esperou-se obter aproximadamente 20 milhões de leituras por amostras, uma cobertura considerada adequada para uma primeira avaliação.

### 5.7.7 Análises de bioinformática

As sequências geradas foram analisadas pelo grupo de bioinformática sob responsabilidade do Dr. Israel Tojal (A.C. Camargo Cancer Center) e pelo Dr. Felipe Gomes Naveca (Instituto Leônidas e Maria Deane - Fundação Oswaldo Cruz). O programa metaSPAdes (109) foi utilizado para montagem *de novo*, *contigs* foram mapeados com o Kraken (110), contra o banco de dados NCBI nt, que contém sequências de todos os eucariotos, bactérias e vírus conhecidos. Além disso, uma segunda estratégia foi aplicada para geração de *contigs* e classificação taxonômica utilizando o programa Kaiju, com o banco de dados *Reference Viral database* (RVDB) que contém sequências: *viral*, *virus-like* e *virus related* (111, 112).

## 5.8 Aspectos éticos

Este projeto é um desdobramento de um projeto maior intitulado “*Caracterização epidemiológica e clínica dos pacientes portadores de carcinoma de células escamosas do pênis e associação com a infecção pelo Papilomavírus Humano*” que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas com protocolo CAAE N° 0516.0.115.000-11 – CEP UFAM aprovado em 07 de dezembro de 2011 (Anexo 10.1). Este estudo foi desenhado tendo como base as determinações da Resolução CNS 466 de 12 de dezembro de 2012 e previa guarda de amostra para estudos posteriores.

Atendendo à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, o projeto “*Análise metagenômica do viroma das neoplasias penianas*” incluía novos objetivos a pesquisa e, portanto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON com protocolo CAAE N° 70834117.0.0000.0004– parecer de aprovação 2.230.007 em 21 de Agosto de 2017 (Anexo 10.2).

O projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) - Número do Cadastro: A5F36C5.

## 5.9 Análise dos dados

Os dados da pesquisa foram organizados em um banco de dados utilizando o programa Epi-Info versão 7.2.1/2017 (CDC, Atlanta, Geórgia, EUA), e, também foi utilizado para a análise por estatística descritiva dos dados.

As variáveis qualitativas foram representadas por frequência absoluta (n) e relativa (%). Para comparações entre variáveis categóricas foi utilizado o teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando recomendado.

As variáveis quantitativas foram representadas por média e desvio padrão. Para comparações dos dois grupos foi aplicado o teste t-Student quando aceitar a hipótese de normalidade dos dados ou teste de Mann-Whitney quando a hipótese de normalidade dos dados for rejeitada.

Modelos de regressão logística univariada e multivariada foram utilizados para analisar a relação entre superexpressão de p16<sup>INK4a</sup>, status de infecção por HPV, perfil sociodemográfico e clínico de pacientes com CP e calcular as razões de chances. A análise de sobrevida foi realizada usando o método Kaplan-Meier para determinar a sobrevida global de pacientes com infecção por HPV, EBV e a superexpressão de p16<sup>INK4a</sup>. O teste log-rank foi utilizado para comparar as curvas de sobrevida.

Será adotado o nível de significância de 0,05 ( $\alpha=5\%$ ). Níveis descritivos inferiores a este valor serão considerados significantes.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos e a discussão da pesquisa serão apresentados na forma de artigos científicos.

**Artigo 01 - Presence of HPV with overexpression of p16<sup>ink4a</sup> protein and EBV infection in penile cancer – A series of cases from Brazil Amazon (Apêndice 11.3)**

**Artigo 02 - Cases study of penile cancer non-HPV/EBV-associated: clinical factors and virome characteristics in a population of the Brazilian Western Amazon (Apêndice 11.4)**

Além disso, quatro artigos completos estão em fase de análises de dados:

**Artigo 03 – Virome analysis of penile cancer non-HPV/EBV-associated from two distinct Brazilian regions (North and Southeast)**

**Artigo 04 –HPV-negative penile squamous cell carcinoma: Somatic recurrent mutation analysis**

**Artigo 05 - Health-related quality of life and sexual function in patients treated for penile cancer**

**Artigo 06 -Epidemiological study of penile cancer in the state of Amazonas, Brazil - Ten years of history**

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitiram concluir que:

- ✓ A idade média dos pacientes no momento do diagnóstico foi de 57,4 anos  $\pm$  DP 17,8, variando de 20 a 90 anos.
- ✓ A maioria dos pacientes (64%) é procedente de áreas rurais do estado da Amazônia
- ✓ 64% (30/47) dos pacientes tinham fimose.
- ✓ 43% (13/30) foram submetidos à circuncisão, a maioria na idade adulta.
- ✓ 60% dos pacientes eram fumantes ou ex-fumantes.
- ✓ A infecção pelo HPV foi observada em 45% (21/47) e o HPV16 foi observado em 13 pacientes. Outros tipos detectados foram HPV6, 11, 42, 51, 53, 68 e 44/55. A infecção por EBV foi observada em 30% (14/47) dos pacientes com PC. Co-infecção com HPV e EBV foi observada em 25% (6/21) dos pacientes.
- ✓ A superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> foi investigada em 26 amostras. A superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> foi observada apenas no HR-HPV 16.
- ✓ Todos os pacientes foram submetidos a penectomia, 32% penectomia total e 68% penectomia parcial. A linfadenectomia foi realizada em 28% dos pacientes.
- ✓ O tipo histológico predominante nos tumores de pênis estudados foi carcinoma de células escamosas (100%). A classificação histopatológica segundo a OMS de 2016 foi realizada em 20 peças anatomopatológica. O subtipo histológico mais comum foi o usual 11/20 (55%).
- ✓ Em 58% dos pacientes, o tumor estava localizado na glândula e no prepúcio e a morfologia predominante era vegetativa (48%).
- ✓ 70% (23/33) dos pacientes apresentaram tumores com grau histológico I e II, (associados à infecção pelo HPV).
- ✓ Na análise de sobrevida, o tempo de seguimento foi de 35,4 meses / paciente. A taxa de mortalidade durante o estudo foi de 38%.
- ✓ A análise bioinformática de high-throughput new generation sequencing para a detecção de vírus oncogênicos em tumores de CP non-HPV/EBV-associado foi realizada através

de dois pipelines distintos. A análise realizada no Kraken resultou em um intervalo de 190-2.232reads (<0,1%) mapeados contra vírus e 458.189 - 1.277.735 reads (~ 6%) pela análise realizada no Kaiju/RVDB.

- ✓ Pelo método de análise de metagenômica utilizado, não foi possível identificar vírus com potencial oncogênico nas amostras de CP analisadas.
- ✓ Curiosamente, entre 10-70% das sequências permaneceram não classificadas, sugerindo o potencial de estudos de sequenciamento metagenômico de alto rendimento, para identificar novos microrganismos possivelmente relacionados ao câncer.

## **8. PERSPECTIVAS E DESDOBRAMENTOS DO ESTUDO**

Como perspectivas futuras, esperamos em breve aprofundar as análises dos dados gerados com o estudo metagenômico dos tumores de pênis.

A partir da parceria com o Laboratório de Genômica Médica do A.C. Camargo Cancer Center e com Laboratory of Viral Metagenomics - Rega Institute for Medical Research - Belgium, correlacionar os dados gerados com o estudo metagenômico dos tumores de pênis de amostras do Estado do Amazonas e do Estado de São Paulo.

Desenvolver iniciadores de PCR específicos para cada tipo viral encontrado para testar uma coleção representativa de várias amostras clínicas (Estado do Amazonas e Estado de São Paulo).

## 9. REFERÊNCIAS

1. Parkin DM, Ferlay J, Curado MP, Bray F, Edwards B, Shin HR, et al. Fifty years of cancer incidence: CI5 I–IX. *International journal of cancer*. 2010;127(12):2918-27.
2. Cardona CEM, García-Perdomo HA. Incidence of penile cancer worldwide: systematic review and meta-analysis. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2018;41:e117.
3. Fonseca AGd, Pinto JASdA, Marques MC, Drosdoski FS, Fonseca Neto LORd. Estudo epidemiológico do câncer de pênis no Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2010;1(2):85-90.
4. Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *International braz j urol*. 2008;34(5):587-93.
5. Christodoulidou M, Sahdev V, Houssein S, Muneer A. Epidemiology of penile cancer. *Current problems in cancer*. 2015;39(3):126-36.
6. Calmon MF, Tasso Mota M, Vassallo J, Rahal P. Penile carcinoma: risk factors and molecular alterations. *The Scientific World Journal*. 2011;11:269-82.
7. de Carvalho NS, Kannenberg AP, Munaretto C, Yoshioka D, Absy MCV, Ferreira MA, et al. Associação entre HPV e câncer peniano: revisão da literatura. *DST-Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis*. 2007;19(2):92-5.
8. Stratton KL, Culkin DJ. A Contemporary Review of HPV and Penile Cancer. *Oncology (Williston Park, NY)*. 2016;30(3):245-9.
9. Miralles-Guri C, Bruni L, Cubilla A, Castellsague X, Bosch FX, De Sanjose S. HPV prevalence and type distribution in penile carcinoma. *Journal of clinical pathology*. 2009.
10. Alemany L, Cubilla A, Halc G, Kasamatsu E, Quiros B, Masferrer E, et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *European Urology*. 2016;69(5):953-61.
11. Alves G, Macrini CMT, de Souza Nascimento P, Morais JC, Ornellas AA. Detection and expression of Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in tissues from penile tumors in Brazil. *Cancer letters*. 2004;215(1):79-82.
12. de Lima MAP, Rabenhorst SHB. Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2006;52(1):87-96.
13. Afonso LA, Moyses N, Alves G, Ornellas AA, Passos MR, Oliveira Ldo H, et al. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(1):18-23.
14. Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, Kosz-Vnenchak M. Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. *Acta biochimica Polonica*. 2009;56(2):337.
15. FIGLIUOLO G, Lima S, Costa S, Silva J, Paiva C, Bezerra J, et al. Perfil clínico-epidemiológico associado a fatores de risco de pacientes com câncer de pênis atendidos em um Hospital de Referência Oncológica em Manaus. Vol. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*. 2015;11(40).
16. Bleeker M, Heideman D, Snijders P, Horenblas S, Dillner J, Meijer C. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World journal of urology*. 2009;27(2):141-50.

17. Johansson H, Bzhalava D, Ekstrom J, Hultin E, Dillner J, Forslund O. Metagenomic sequencing of "HPV-negative" condylomas detects novel putative HPV types. *Virology*. 2013;440(1):1-7.
18. Bleeker M, Heideman D, Snijders P, Horenblas S, Dillner J, Meijer C. Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World journal of urology*. 2009;27(2):141.
19. Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Pow-Sang J, Guiliano AR, editors. Incidence trends in primary malignant penile cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*; 2007: Elsevier.
20. Arya M, Li R, Pegler K, Sangar V, Kelly JD, Minhas S, et al. Long-term trends in incidence, survival and mortality of primary penile cancer in England. *Cancer Causes & Control*. 2013;24(12):2169-76.
21. Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. *The lancet oncology*. 2004;5(4):240-7.
22. Takiar R, Kumar S. Pattern of reproductive cancers in India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:599-603.
23. Wabinga HR, Parkin DM, Wabwire-Mangen F, Namboozee S. Trends in cancer incidence in Kyadondo County, Uganda, 1960-1997. *British journal of cancer*. 2000;82(9):1585-92.
24. Wabinga HR, Namboozee S, Amulen PM, Okello C, Mbus L, Parkin DM. Trends in the incidence of cancer in Kampala, Uganda 1991–2010. *International journal of cancer*. 2014;135(2):432-9.
25. Martins VA, Pinho JD, Teixeira Junior AAL, Nogueira LR, Silva FF, Maulen VE, et al. P16INK4a expression in patients with penile cancer. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205350. Epub 2018/10/13.
26. BRASIL. Ministério da saúde. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Disponível em <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/> 2019.
27. FCECON. RELATÓRIO ANUAL DE GESTÃO 2018 - Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas Amazonas2018.
28. Pow-Sang MR, Benavente V, Pow-Sang JE, Morante C, Meza L, Baker M, et al. Cancer of the penis. *Cancer control*. 2002;9(4):305-14.
29. Paiva GR, de Oliveira Araújo IB, Athanazio DA, de Freitas LAR. Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis. *International urology and nephrology*. 2015;47(2):295-9.
30. Reis AAdS, Paula LBd, Paula AAPd, Saddi VA, Cruz ADd. Aspectos clínico-epidemiológicos associados ao câncer de pênis. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2010;15(suppl 1):1105-11.
31. Letendre J, Saad F, Lattouf J-B. Penile cancer: what's new? Current opinion in supportive and palliative care. 2011;5(3):185-91.
32. Larke NL, Thomas SL, dos Santos Silva I, Weiss HA. Male circumcision and penile cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes & Control*. 2011;22(8):1097-110.
33. Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behaviour? *Bmj*. 1987;295(6609):1306-8.

34. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *International journal of cancer*. 2005;116(4):606-16.
35. Wang-Chesebro A, Foster W, Gottschalk AR. Cancer of the penis. *Handbook of Evidence-Based Radiation Oncology*: Springer; 2010. p. 479-85.
36. Villa LL, Lopes A. Human papillomavirus DNA sequences in penile carcinomas in Brazil. *International journal of cancer*. 1986;37(6):853-5.
37. Harris TG, Kulasingam SL, Kiviat NB, Mao C, Agoff SN, Feng Q, et al. Cigarette smoking, oncogenic human papillomavirus, Ki-67 antigen, and cervical intraepithelial neoplasia. *American journal of epidemiology*. 2004;159(9):834-42.
38. Schabath MB, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Salmerón J, Quiterio M, Giuliano AR. Smoking and human papillomavirus (HPV) infection in the HPV in Men (HIM) study. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2011.
39. Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *International journal of biological sciences*. 2011;7(5):651.
40. Strausberg RL. Tumor microenvironments, the immune system and cancer survival. *Genome biology*. 2005;6(3):211.
41. Zequi SdC, Guimarães GC, da Fonseca FP, Ferreira U, de Matheus WE, Reis LO, et al. Sex with animals (SWA): behavioral characteristics and possible association with penile cancer. A multicenter study. *The journal of sexual medicine*. 2012;9(7):1860-7.
42. Luo GG, Ou J-hJ. Oncogenic viruses and cancer. *Virologica Sinica*. 2015;30(2):83-4.
43. Campbell CMP, Messina JL, Stoler MH, Jukic DM, Tommasino M, Gheit T, et al. Cutaneous human papillomavirus types detected on the surface of male external genital lesions: a case series within the HPV Infection in Men Study. *Journal of Clinical Virology*. 2013;58(4):652-9.
44. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn L-J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32:43-51.
45. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, De Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2:16086.
46. Levi JE, Rahal P, Sarkis AS, Villa LL. Human papillomavirus DNA and p53 status in penile carcinomas. *International journal of cancer*. 1998;76(6):779-83.
47. Pow-Sang M, Astigueta J. HPV infection and the risk of penile cancer. *Journal of Andrological Sciences*. 2009;16:1-6.
48. Kashofer K, Winter E, Halbwedl I, Thueringer A, Kreiner M, Sauer S, et al. HPV-negative penile squamous cell carcinoma: disruptive mutations in the TP53 gene are common. *Mod Pathol*. 2017;30(7):1013-20. Epub 2017/04/08.
49. Spiess PE, Dhillon J, Baumgarten AS, Johnstone PA, Giuliano AR. Pathophysiological basis of human papillomavirus in penile cancer: key to prevention and delivery of more effective therapies. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2016;66(6):481-95.
50. Chipollini J, Chaing S, Azizi M, Kidd LC, Kim P, Spiess PE. Advances in Understanding of Penile Carcinogenesis: The Search for Actionable Targets. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(8):1777.

51. Tang DH, Clark PE, Giannico G, Hameed O, Chang SS, Gellert LL. Lack of P16 ink4a Over Expression in Penile Squamous Cell Carcinoma is Associated with Recurrence after Lymph Node Dissection. *The Journal of urology*. 2015;193(2):519-25.
52. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science*. 2006;110(5):525-41.
53. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*. 2015;25(S1):2-23.
54. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;2003(348):518-27.
55. Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR. Prevalence of HPV infection among men: a systematic review of the literature. *The Journal of infectious diseases*. 2006;194(8):1044-57.
56. Djajadiningrat RS, Jordanova ES, Kroon BK, van Werkhoven E, de Jong J, Pronk DT, et al. Human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer and association with clinical outcome. *The Journal of urology*. 2015;193(2):526-31.
57. Dorfman S, Cavazza M, Cardozo J. Penile cancer associated with so-called low-risk human papilloma virus. Report of five cases from rural Venezuela. *Tropical doctor*. 2006;36(4):232-3.
58. Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis. *Cancer*. 2001;91(12):2315-21.
59. Scheiner MA, Campos MM, Ornellas AA, Chin EW, Ornellas MH, Andrada-Serpa MJ. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. *International braz j urol*. 2008;34(4):467-76.
60. de Sousa IDB, Vidal FCB, Vidal JPCB, de Mello GCF, Nascimento MdDSB, Brito LMO. Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. *BMC urology*. 2015;15(1):13.
61. Flaherty A, Kim T, Giuliano A, Magliocco A, Hakky TS, Pagliaro LC, et al., editors. Implications for human papillomavirus in penile cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*; 2014: Elsevier.
62. Zur Hausen H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-reviews on cancer*. 1996;1288(2):F55-F78.
63. Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(6):506-11. Epub 1999/03/24.
64. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *The Lancet*. 1964;283(7335):702-3.
65. Lam KY, Chan AC, Chan KW, Leung ML, Srivastava G. Absence of Epstein-Barr virus in penile carcinoma. A study of 42 cases using in situ hybridization. *Cancer*. 1995;76(4):658-60.
66. Afonso LA, Carestiato FN, Ornellas AA, Ornellas P, Rocha WM, Cordeiro TI, et al. Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, and methylation status of p16ink4a in penile cancer. *J Med Virol*. 2017.
67. Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. *Fields virology*. 2001.

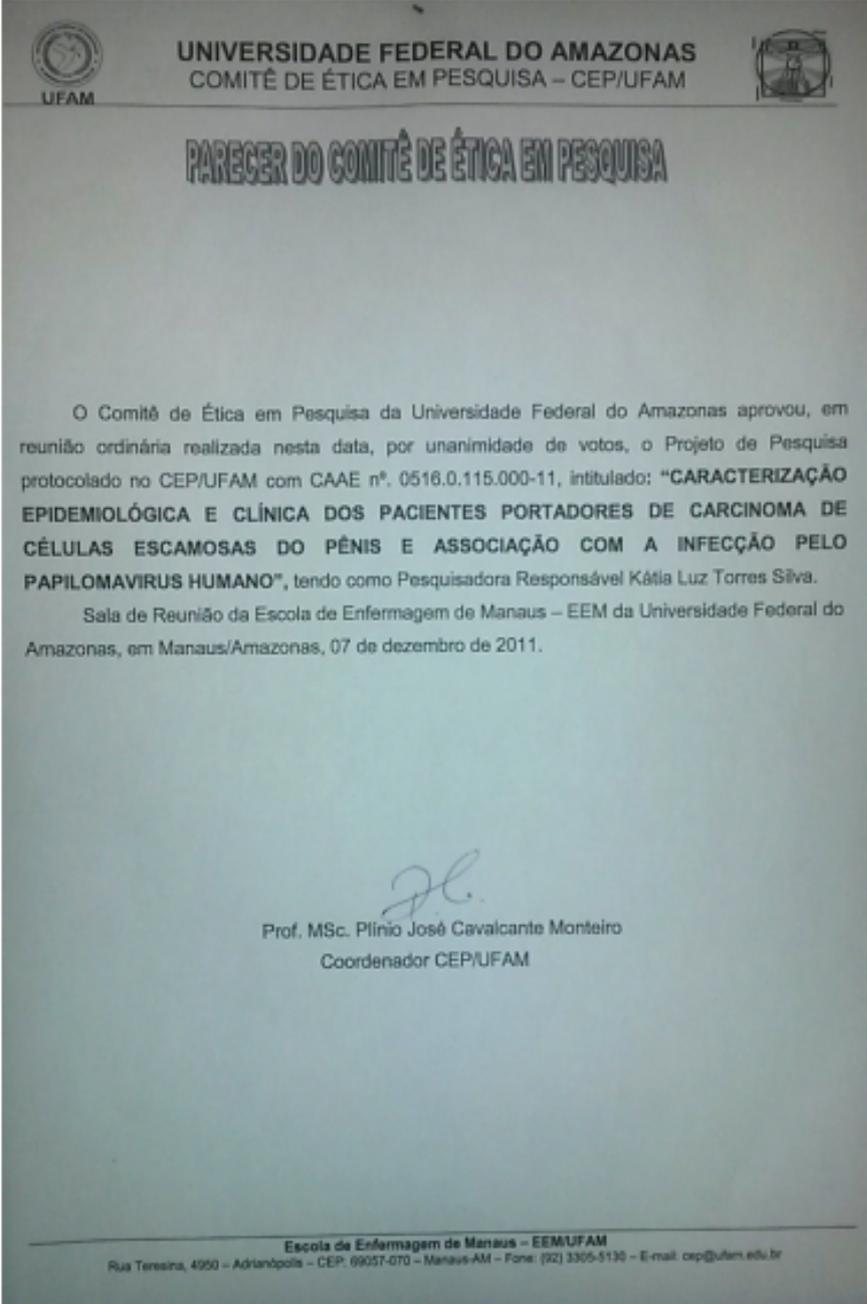
68. Murray P, Young L. Themed issue: the biology and pathology of the Epstein-Barr virus. *Molecular Pathology*. 2000;53(5):219.
69. Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*. 2003;22(33):5108.
70. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(7):481-92.
71. Ambinder RF, Mann RB. Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. *The American journal of pathology*. 1994;145(2):239.
72. Kruk J, Y Aboul-Enein H. Reactive oxygen and nitrogen species in carcinogenesis: implications of oxidative stress on the progression and development of several cancer types. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2017;17(11):904-19.
73. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*. 2014;27:16-25.
74. Mosconi AM, Roila F, Gatta G, Theodore C. Cancer of the penis. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2005;53(2):165-77. Epub 2005/01/22.
75. Salvioni R, Necchi A, Piva L, Colecchia M, Nicolai N, editors. *Penile cancer. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*; 2009: Elsevier.
76. Barros ÉNd, Melo MCBd. Câncer de pênis: perfil sócio-demográfico e respostas emocionais à penectomia em pacientes atendidos no Serviço de Psicologia do Hospital de Câncer de Pernambuco. *Revista da SBPH*. 2009;12(1):99-111.
77. Costa S, Rodrigues R, Barbosa L, Silva J, de Caldas Brandão JO, de Medeiros CSQ. Câncer de pênis: epidemiologia e estratégias de prevenção. *Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-FACIPE*. 2013;1(2):23-33.
78. Pompeo ACL BA. Carcinoma epidermóide do pênis. *Uropatologia - Pênis. Int Braz J Urol*. 2003;29:44-50.
79. Ornellas A, Brown G, Ferreira C, Rocha J. Câncer urológico (câncer de pênis). Ferreira CG, Rocha JC *Oncologia molecular São Paulo: Atheneu*. 2004:224-9.
80. Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA. Penile cancer. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2006;54(3):369-91; quiz 91-4.
81. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part A: renal, penile, and testicular tumours. *European urology*. 2016;70(1):93-105.
82. Cubilla AL. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. *World journal of urology*. 2009;27(2):169.
83. Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB. Updates in the eighth edition of the tumor-node-metastasis staging classification for urologic cancers. *European urology*. 2018;73(4):560-9.
84. Jackson S. The treatment of carcinoma of the penis. *British Journal of Surgery*. 1966;53(1):33-5.

85. Wollina U, Steinbach F, Verma S, Tchernev G. Penile tumours: a review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2014;28(10):1267-76.
86. Culp SH, Pettaway CA. Penile Cancer: New Insights into the “Way Forward” for this Rare Disease. *The Journal of urology*. 2015;193(2):394-5.
87. Canter DJ, Nicholson S, Watkin N, Hall E, Pettaway C. The International Penile Advanced Cancer Trial (InPACT): Rationale and Current Status. *European urology focus*. 2019.
88. Barzon L, Cappellesso R, Peta E, Militello V, Sinigaglia A, Fassan M, et al. Profiling of expression of human papillomavirus–related cancer miRNAs in penile squamous cell carcinomas. *The American journal of pathology*. 2014;184(12):3376-83.
89. Chahoud J, Pickering CR, Pettaway CA. Genetics and penile cancer: recent developments and implications. *Current opinion in urology*. 2019;29(4):364-70.
90. Schloss PD, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2003;14(3):303-10.
91. Sarid R, Gao S-J. Viruses and human cancer: from detection to causality. *Cancer letters*. 2011;305(2):218-27.
92. Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palù G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(11):7861-84.
93. Velázquez E, Peix Á, Gómez-Alonso A. Microorganismos y cáncer: evidencias científicas y nuevas hipótesis. *Cirugía Española*. 2011;89(3):136-44.
94. Cardenas E, Tiedje JM. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008;19(6):544-9.
95. Baldwin DA, Feldman M, Alwine JC, Robertson ES. Metagenomic Assay for Identification of Microbial Pathogens in Tumor Tissues. *mBio*. 2014;5(5):e01714-14.
96. Polson SW, Wilhelm SW, Wommack KE. Unraveling the viral tapestry (from inside the capsid out). *The ISME journal*. 2011;5(2):165.
97. Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current opinion in virology*. 2012;2(1):63-77.
98. Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. *Nature reviews Genetics*. 2019;20:341-55.
99. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science (New York, NY)*. 2008;319(5866):1096-100.
100. Bzhalava D, Johansson H, Ekström J, Faust H, Möller B, Eklund C, et al. Unbiased approach for virus detection in skin lesions. *PloS one*. 2013;8(6):e65953.
101. Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. *Nat Rev Genet*. 2019;20(6):341-55. Epub 2019/03/29.
102. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, NY)*. 1985;230(4732):1350-4.
103. Veo CA, Saad SS, Fregnani JHT, Scapulatempo-Neto C, Tsunoda AT, Resende JCP, et al. Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA. *Tumor Biology*. 2015;36(7):5399-405.

104. Gravitt P, Peyton C, Alessi T, Wheeler C, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):357-61.
105. Heard I, Cuschieri K, Geraets D, Quint W, Arbyn M. Clinical and analytical performance of the PapilloCheck HPV-Screening assay using the VALGENT framework. *Journal of Clinical Virology.* 2016;81:6-11.
106. Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N, Plakokefalos E, Tzanakaki G, Kourea-Kremastinou J. Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. *Journal of clinical microbiology.* 2001;39(12):4426-32.
107. Conceição-Neto N, Zeller M, Lefrère H, De Bruyn P, Beller L, Deboutte W, et al. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Scientific reports.* 2015;5:16532.
108. Kohl C, Brinkmann A, Dabrowski PW, Radonić A, Nitsche A, Kurth A. Protocol for metagenomic virus detection in clinical specimens. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(1):48.
109. Cantalupo PG, Katz JP, Pipas JM. Viral sequences in human cancer. *Virology.* 2018;513:208-16.
110. Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 2014;15(3):R46. Epub 2014/03/04.
111. Menzel P, Ng KL, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature communications.* 2016;7:11257.
112. Goodacre N, Aljanahi A, Nandakumar S, Mikailov M, Khan AS. A Reference Viral Database (RVDB) To Enhance Bioinformatics Analysis of High-Throughput Sequencing for Novel Virus Detection. *mSphere.* 2018;3(2). Epub 2018/03/23.

## 10. ANEXO(S)

### 10.1 Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas com Protocolo Caae N° 0516.0.115.000-11 – Cep Ufam



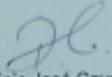
The image shows the cover page of a document from the Universidade Federal do Amazonas (UFAM) Ethics Committee in Research (CEP/UFAM). The document is titled "PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA". It contains a paragraph stating that the committee approved a research project on December 7, 2011, by unanimous vote. The project is titled "CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICA DOS PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DO PÊNIS E ASSOCIAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO" and is led by Kátia Luz Torres Silva. The meeting took place at the School of Nursing of Manaus (EEM) at UFAM. The document is signed by Prof. MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro, the coordinator of CEP/UFAM. At the bottom, there is contact information for the EEM/UFAM, including the address, CEP, phone number, and email.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UFAM

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

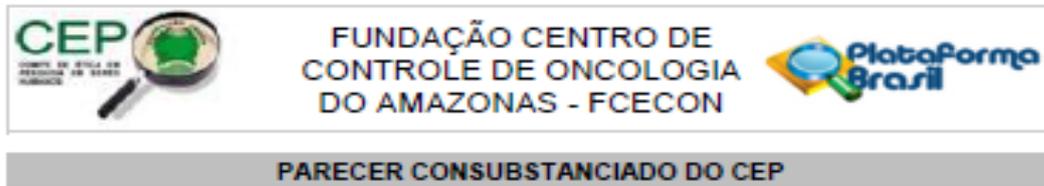
O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0516.0.115.000-11, intitulado: **"CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICA DOS PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DO PÊNIS E ASSOCIAÇÃO COM A INFECÇÃO PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO"**, tendo como Pesquisadora Responsável Kátia Luz Torres Silva.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 07 de dezembro de 2011.

  
Prof. MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro  
Coordenador CEP/UFAM

Escola de Enfermagem de Manaus – EEM/UFAM  
Rua Teresina, 4950 – Adrianópolis – CEP: 69057-070 – Manaus-AM – Fone: (92) 3365-5130 – E-mail: cep@ufam.edu.br

**10.2** Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas com Protocolo Caae N° 70834117.0.0000.0004– CEP FCECON



**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Análise metagenômica do viroma das neoplasias penianas.

**Pesquisador:** VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS

**Área Temática:**

**Versão:** 3

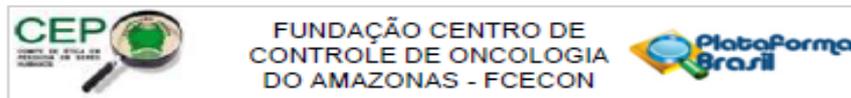
**CAAE:** 70834117.0.0000.0004

**Instituição Proponente:** Diretoria de Ensino e Pesquisa

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.230.007



Continuação do Parecer: 2.230.007

Outros	Anuencia_Urologia_Foecon.pdf	03/07/2017 19:51:07	MARTINS	Aceito
--------	------------------------------	------------------------	---------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 21 de Agosto de 2017

Assinado por:  
Paulo José Benevides dos Santos  
(Coordenador)

## 11. APÊNDICES

### 11.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

Nós, Valquíria Carmo dos Alves Martins e Kátia Luz Torres Silva - pesquisadores da Fundação Centro de Controle em Oncologia – FCECON, estamos convidando o senhor a participar do estudo intitulado “ANÁLISE METAGENÔMICA DO VIROMA DAS NEOPLASIAS PENIANAS” este estudo vai nos ajudar a conhecer como a doença começa a acontecer e dessa maneira poder ajudar outros pacientes.

- a) O objetivo principal desses estudos é investigar os vírus envolvidos no surgimento da doença (infeciosas e não infecciosas) do pênis.
- b) Caso o senhor participe da pesquisa será necessário conceder uma entrevista aos pesquisadores informando sobre dados pessoais e sobre características da sua doença. Deverá permitir também que os pesquisadores olhem o seu prontuário para procurar informações sobre o manejo médico do seu caso e para complementar informação que não foram elucidadas na entrevista.
- c) A aplicação do questionário e a entrevista serão realizadas após sua consulta de rotina no ambulatório de Urologia da Fundação Centro de Controle de Oncologia – FCECON.
- d) No caso de tratamento cirúrgico será coletada amostra da lesão no momento da coleta de material para biopsia, este material será utilizado para a pesquisa da possível presença da infecção por vírus.
- e) É possível que durante a sua participação na pesquisa o senhor experimente algum desconforto ou constrangimento ao responder a entrevista e o questionário relacionado ao fato de poder lembrar-se de momentos tristes e difíceis da doença. É importante lembrar que a abordagem será feita por profissionais da área da saúde, os quais ao perceberem qualquer impacto psicológico gerado ao senhor, o encaminharão ao setor de psicologia da unidade.
- f) Sua identidade pessoal e/ou profissional será excluída de todos e quaisquer produtos da pesquisa para fins de publicação científica. Caso a pesquisa lhe cause algum dano explicitado nos riscos ou ocorrido em razão de sua participação na pesquisa, seu direito de indenização será garantido.
- g) Os benefícios gerados nessa pesquisa são: saber mais sobre o perfil clínico e histopatológico do paciente portador de carcinoma de células escamosas ou não, bem

como o impacto da cirurgia na qualidade de vida e sexual destes homens. O senhor não será beneficiado financeiramente ou de qualquer outra forma pelos resultados da pesquisa, porém contribuirá para o avanço do mundo científico de forma significativa.

- h) Os pesquisadores Mestra Valquíria do Carmo Alves Martins (número disponível para contato: 36554774) responsável pelo projeto e os acadêmicos: Paloma Menezes de Souza, Felipe Luz Torres Silva e Laís de Souza e Silva, colaboradores do projeto estarão disponíveis nesse número de telefone ou no terceiro andar da Fundação Centro de Controle de oncologia – FCECON, no Departamento de Ensino e pesquisa, para esclarecimento de qualquer dúvida que o senhor possa ter ou para dar qualquer informação que queira referente à sua participação no estudo, antes, durante ou depois do encerramento do projeto.
- i) A sua participação no estudo é voluntária, não recebendo qualquer benefício. O senhor pode desistir a qualquer momento e retirar seu consentimento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma seu tratamento e acompanhamento na FCECON.
- j) O senhor consente a equipe de pesquisadores registrarem imagens através de fotografias dos locais lecionados, os pesquisadores se comprometem em preservar sua identidade.
- k) Os materiais coletados do senhor (amostras da peça cirúrgica) serão utilizados exclusivamente para atender os objetivos da pesquisa. As amostras colhidas nesse trabalho serão armazenadas em Biorrepositórios primeiramente, que se destinam a ser um tipo de depósito onde as amostras ficarão armazenadas no tempo de realização deste projeto de pesquisa, cuja guarda ficará com o pesquisador principal Dra. Valquíria Carmo dos Alves Martins e de responsabilidade institucional da FCECON, neste depósito permanecerá o tempo programado para realização do trabalho. Caso haja necessidade poderá ser prolongada mediante justificativa e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Seu material biológico será armazenado sobre um sistema seguro de identificação, que garante o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos seus dados, para fornecimento de informações de seu interesse ou para a obtenção de consentimento específico para utilização em nova pesquisa;

Por isso torna-se necessário que marque qualquer alternativa abaixo, que condiz com sua participação nesse estudo:

- (  ) Necessidade de novo consentimento a cada pesquisa (a cada nova pesquisa o pesquisador responsável entrará em contato para adquirir novo termo de consentimento livre e esclarecido).

( ) Dispensa de novo consentimento a cada pesquisa (seu material biológico poderá ser utilizado para pesquisa futuras sem a necessidade de novo termo de consentimento livre e esclarecido).

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi tratou de riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Assino o presente documento em duas vias de igual teor e forma, ficando uma em minha posse. Sendo assim, eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

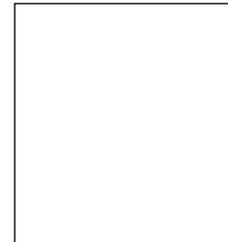
Manaus, \_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_

---

Nome e Assinatura do sujeito da pesquisa

---

Nome e Assinatura do pesquisador responsável



## 11.2 Instrumento de coleta de dados.

### 1. Identificação

Número do paciente no projeto: \_\_\_\_\_

Data da coleta de dados: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Responsável pela coleta de dados: \_\_\_\_\_

Número do prontuário: \_\_\_\_\_

Iniciais do paciente: \_\_\_\_\_

Cidade onde reside: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Endereço de estadia em Manaus (casa de familiar que fica hospedado, caso seja um paciente do

interior): \_\_\_\_\_

Telefone (preencha sempre com dois contatos): \_\_\_\_\_

Data da coleta da amostra (peça cirúrgica): \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Laboratório para onde a biópsia foi enviada: \_\_\_\_\_

### 2. Dados Sociais e Ambientais

2.1 Trabalho: Ocupação: \_\_\_\_\_

2.2 Nível de Instrução

( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto ( ) 1º grau completo

( ) 2º grau incompleto ( ) 2º grau completo ( ) superior incompleto  
( ) superior completo

2.3 Estado Civil

( ) solteiro ( ) casado ( ) viúvo ( ) divorciado ( ) União estável

2.4 Renda Familiar

( ) menor que um salário mínimo ( ) entre 1 e 6 salários mínimos  
( ) entre 6 e 10 salários mínimos ( ) acima de 10 salários mínimos  
( ) não sabe referir

2.5 Número de Filhos: \_\_\_\_\_ vivos: \_\_\_\_\_ falecidos: \_\_\_\_\_

2.6 Local de Residência

- Perímetro: ( ) urbano ( ) rural

- Número de pessoas que residem na mesma casa: \_\_\_\_\_

- Procedência (cidade/estado): \_\_\_\_\_

### 3 Dados Relacionados à Biologia do Indivíduo

3.1. Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ / Idade na época do atendimento: \_\_\_\_\_

3.2. Raça: ( ) branca ( ) preta ( ) parda ( ) indígena ( ) amarela

### 3.3. Na família

Pai: ( ) vivo ( ) falecido Causa da morte: \_\_\_\_\_

Mãe: ( ) viva ( ) falecida Causa da morte: \_\_\_\_\_

Irmão (s): ( ) vivo(s) ( ) falecido(s) Causa da morte:

\_\_\_\_\_

### 3.4 Na família já houve algum outro caso de câncer?

( ) sim ( ) não Especificar parentesco:

\_\_\_\_\_

### 3.5 História prévia de doença sexualmente transmissível? ( ) não ( ) sim

Se sim, 3.6 Tipo de DST

( ) Não sabe ( ) Gonorreia ( ) Sífilis ( ) Uretrite ( ) AIDS ( ) Condiloma acuminado

( ) Outras. Especifique: \_\_\_\_\_

### 3.7 Idade da primeira relação sexual: \_\_\_\_\_

3.8 Parceira com câncer de colo de útero: ( ) Não ( ) Sim ( ) Ignorado

3.9 Parceira com infecção pelo HPV: ( ) Não ( ) Sim ( ) Ignorado

3.10. Apresenta ou apresentou diagnóstico de infecção por HPV? ( ) não ( ) sim ( )

Ignorado

3.11. Apresenta fimose? ( ) não ( ) sim

3.12 Postectomia? ( ) não ( ) sim

Se sim, 3.13 Época de realização da cirurgia de postectomia:

( ) Infância ( ) Adolescência ( ) Vida adulta

3.14. Atualmente faz tratamento para algum outro tipo de doença?

( ) não ( ) sim. Especifique: \_\_\_\_\_

3.15. Apresentou doenças pré-neoplásicas? ( ) não ( ) sim

Qual? ( ) Leucoplasias ( ) Balanite xerótica obliterante ( ) Doença de Bowen

( ) Papulose Bowenóide ( ) Condiloma acuminado ( ) Queyrat

Outra (especifique): \_\_\_\_\_

3.16 Idade em que manifestou o CCEP (anos): \_\_\_\_\_

### 3 Dados Relacionados ao Atendimento de Saúde

3.1. Além do Fcecon, utiliza algum outro serviço de saúde? ( ) não ( ) sim.

Se sim, ( ) rede pública ( ) rede privada

3.2. Em que ocasiões:

( ) periodicamente para prevenir doenças ( ) periodicamente, pois faz tratamento médico

( ) em casos de urgência ( ) outros. Especifique: \_\_\_\_\_

3.3. Número de consultas até o diagnóstico: ( ) uma ( ) duas ( ) três ou mais

3.4. Número de médicos consultados até o momento do diagnóstico:

( ) um ( ) dois ( ) três ou mais

#### 4 Dados Relacionados ao Estilo de Vida

4.1. *Apresenta ou apresentava vida sexual ativa?* ( ) não ( ) sim

Se sim: Quando foi a sua última relação sexual?

4.2 *Caso apresente vida sexual ativa toma as devidas precauções em relação à prevenção de doenças sexualmente transmissíveis?* ( ) não ( ) sim

4.2. *Com relação ao hábito de fumar:*

( ) fumante / Fuma há quanto tempo? \_\_\_\_\_ Quantidade de cigarros/dia? \_\_\_\_\_

( ) ex-fumante / Parou há quanto tempo? \_\_\_\_\_ Quantidade de cigarros/dia?

\_\_\_\_\_

( ) não fumante

4.3. *Se não fumante (ou ex-fumante), compartilha de locais fechados com fumantes em seu dia-a-dia?* ( ) não ( ) sim: Onde? ( ) casa ( ) trabalho ( ) outros. Especifique:

\_\_\_\_\_

4.4. *Faz uso de algum medicamento?* ( ) não ( ) sim. Especifique:

\_\_\_\_\_

4.5. *Possui boa adesão ao tratamento com esses medicamentos?* ( ) não ( ) sim

---

#### 5 Dados Relacionados à Descrição das Lesões

##### Dados clínicos (antes da cirurgia):

5.1 *Tempo decorrido entre o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas e a procura pelo serviço de saúde?*

( ) menor que 15 dias ( ) maior que 15 dias e menor que um mês

( ) maior que um mês e menor que seis meses ( ) maior que 15 dias e menor que um mês

( ) maior que seis meses e menor que um ano ( ) maior que 15 dias e menor que um mês

( ) maior ou igual a um ano.

5.2 *Tempo decorrido da procura pelo serviço de saúde até a primeira consulta ambulatorial (quanto tempo para conseguir a primeira consulta no Fcecon)*

( ) menor que 15 dias ( ) maior que 15 dias e menor que um mês

( ) maior que um mês e menor que seis meses ( ) maior que seis meses e menor que um ano

( ) maior que um ano.

5.3 *Data do diagnóstico de CCEP:* \_\_\_\_\_

5.4 *Biópsia:* ( ) sim (paciente já veio com biópsia na primeira consulta ambulatorial?) ( ) não

5.5 *Tempo entre o aparecimento da lesão e a biópsia (meses):*

\_\_\_\_\_

5.6 *Tratamentos prévios antes da biópsia*

( ) Não ( ) Tópico ( ) Injetável ( ) Oral

5.7 *Laudo da biópsia*

( ) CEEP bem diferenciado ( ) CEEP moderadamente diferenciado  
 ( ) CEEP indiferenciado ( ) Carcinoma “in situ”  
 ( ) Câncer verrucoso ( ) Sarcoma ( ) Outros

5.8 *Grau de acordo com a biópsia:* ( ) G I ( ) G II ( ) G III ( ) G IV

5.9 *Tipo de lesão segundo a classificação macroscópica:* ( ) vegetante ( ) ulcerada

5.10 *Localização topográfica das lesões:* ( ) glande ( ) prepúcio ( ) corpo ( ) base  
 ( ) glande e prepúcio ( ) glande, prepúcio e haste ( ) todo o órgão

5.11 *Tamanho da lesão (cm):* \_\_\_\_\_

5.12 *Presença e tipo alterações de linfonodos inguinais palpáveis?*

a) ( ) não ( ) sim  
 b) ( ) Unilaterais ( ) Bilaterais  
 c) ( ) Móveis ( ) Fixos

5.13 *Acometimento de linfonodos pélvicos?* ( ) Não ( ) Sim

5.14 *Estágio da doença (Classificação TNM)*

a) Estadiamento PT: ( ) TIS ( ) T1 ( ) T2 ( ) T3 ( ) T4  
 b) Estadiamento PN: ( ) N0 ( ) N1 ( ) N2 ( ) N3 ( ) NX  
 c) Estadiamento PM: ( ) M0 ( ) M1

5.15. *Apresentou metástases?*

( ) não ( ) sim Localização:

5.16 *Invasibilidade* ( ) Pele ( ) Tecido conjuntivo subepitelial ( ) Corpo cavernoso ( ) Corpo esponjoso ( ) Uretra ( ) Escroto ( ) Região inguinal ( ) Osso púbico

5.17 *Profundidade da infiltração tumoral (cm):*

**Dados baseados na análise da peça cirúrgica:**

5.18. *Realizou tratamento cirúrgico?* ( ) não ( ) sim

5.19 *Caso tenha realizado o tratamento cirúrgico, qual o tipo de tratamento empregado?*

( ) Penectomia parcial ( ) Penectomia radical

5.20. *Realizou linfadenectomia inguinal?* ( ) não ( ) precoce ( ) tardia ( ) modificada

5.21. *Realizou linfadenectomia ilíaca?* ( ) não ( ) precoce ( ) tardia ( ) modificada

5.22 *Resultado da biópsia referente à peça cirúrgica (seja ela de penectomia parcial ou total)*

( ) CEEP bem diferenciado ( ) CEEP moderadamente diferenciado  
 ( ) CEEP indiferenciado ( ) Carcinoma “in situ”  
 ( ) Câncer verrucoso ( ) Sarcoma ( ) Outros

5.23 *Estadiamento TNM com base na avaliação da peça cirúrgica*

a) Estadiamento PT: ( ) TIS ( ) T1 ( ) T2 ( ) T3 ( ) T4

b) Estadiamento PN: ( ) N0 ( )N1 ( )N2 ( )N3 ( )NX

c) Estadiamento PM: ( ) M0 ( )M1

5.24 *Grau após análise da peça cirúrgica*

( ) G I ( ) G II ( ) G III ( ) G IV

5.25. *Realizou tratamento paliativo?*

( ) Quimioterapia sistêmica ( ) Quimioterapia tópica

( ) Radioterapia

5.26 *Quimioterapia no pós-operatório?* ( ) não ( ) sim

**6.0 Informações adicionais para se somarem aos dados do questionário sobre qualidade de vida e sexual**

6.1. Após a sua cirurgia, quanto tempo demorou para ter desejo de ter relações sexuais:

( ) menor que 15 dias ( ) maior que 15 dias e menor que um mês

( ) maior que um mês e menor que seis meses ( ) maior que 15 dias e menor que um mês

( ) maior que seis meses e menor que um ano ( ) maior que 15 dias e menor que um mês

( ) maior ou igual a um ano ( ) não tenho desejo de ter relação sexual.

6.2. Após a sua cirurgia, quanto tempo demorou para ter sua primeira relação sexual?

( ) menor que 15 dias ( ) maior que 15 dias e menor que um mês

( ) maior que um mês e menor que seis meses ( ) maior que 15 dias e menor que um mês

( ) maior que seis meses e menor que um ano ( ) maior que 15 dias e menor que um mês

( ) maior ou igual a um ano ( )ainda não tive relação sexual

**7.0 Seguintos (datas das consultas ambulatoriais, entrevistador este item deve se manter atualizado).**

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**11.3 Artigo científico 01 - PRESENCE OF HPV WITH OVEREXPRESSION OF P16 INK4A PROTEIN AND EBV INFECTION IN PENILE CANCER – A SERIES OF CASES FROM BRAZIL AMAZON**

Publicado na *Plos One*

## RESEARCH ARTICLE

# Presence of HPV with overexpression of p16<sup>INK4a</sup> protein and EBV infection in penile cancer—A series of cases from Brazil Amazon

Valquíria do Carmo Alves Martins<sup>1,2,3</sup>\*, Isabela Werneck Cunha<sup>4,5</sup>, Giuseppe Figliuolo<sup>1,6</sup>, Heidy Halanna de Melo Farah Rondon<sup>2</sup>, Paloma Menezes de Souza<sup>6</sup>, Felipe Luz Torres Silva<sup>2</sup>, Guilherme Luz Torres Silva<sup>6</sup>, Michele de Souza Bastos<sup>7</sup>, Daniel Barros de Castro<sup>3,8</sup>, Monique Freire Santana<sup>1,7</sup>, Rajendranath Ramasawmy<sup>3,7,9</sup>, José Eduardo Levi<sup>10</sup>, Kátia Luz Torres<sup>1,2,3</sup>

**1** Department of Education and Research, Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **2** Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **3** Genomic Health Surveillance Network: Optimization of Assistance and Research in The State of Amazonas – REGESAM, Manaus, Amazonas, Brazil, **4** Department of Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, **5** Department of Pathology, Rede D'OR- São Luiz, São Paulo, Brazil, **6** Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **7** Department of Virology, Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil, **8** Technical Advisory, Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **9** Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Manaus, Amazonas, Brazil, **10** Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

\* These authors contributed equally to this work.

\* [alvesvalquiria@yahoo.com.br](mailto:alvesvalquiria@yahoo.com.br)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Martins VdCA, Cunha IW, Figliuolo G, Rondon HHdMF, de Souza PM, Torres Silva FL, et al. (2020) Presence of HPV with overexpression of p16<sup>INK4a</sup> protein and EBV infection in penile cancer—A series of cases from Brazil Amazon. PLoS ONE 15(5): e0232474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232474>

**Editor:** Marc O. Siegel, George Washington University, UNITED STATES

**Received:** December 18, 2019

**Accepted:** April 15, 2020

**Published:** May 6, 2020

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232474>

**Copyright:** © 2020 Martins et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are in the paper and in the Supporting information.

## Abstract

### Background

In Brazil, penile cancer (PC) is not uncommon. The highest incidence of PC is in the North and Northeast of the country. In addition to phimosis, the Human Papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr Virus (EBV) infections are also related as risk factors for PC. The overexpression of p16<sup>INK4a</sup> is a surrogate sensitive marker of HPV infection in PC.

### Objectives

To correlate p16<sup>INK4a</sup> overexpression and HPV infection status with EBV infection in a series of PC patients from the Amazon region.

### Methods

Tumor tissues from 47 PC cases were analyzed for the presence of HPV and EBV DNA by PCR. All PC patients were diagnosed between 2013 and 2018 at a public reference cancer center hospital in Manaus, Amazonas—Brazil. HPV was genotyped using E7 HPV16/HPV18 type-specific real-time PCR and the PapilloCheck<sup>®</sup> HPV-Screening assay. p16<sup>INK4a</sup> expression was evaluated by immunohistochemistry using the automated Ventana<sup>®</sup> BenchMark Ultra.

**Funding:** This work was supported by The Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas- FAPEAM for financial support (PROGRAMA UNIVERSAL AMAZONAS N.021/2011-FAPEAM; PROGRAMA PAPAC N.020/2013 – FAPEAM; PROGRAMA PAPAC N.05/2019 – FAPEAM and PROGRAMA PRÓ ESTADO N.002./2008-FAPEAM). The Rede D'OR- São Luiz provided support in the form of a salary for author Isabela Werneck Cunha IW, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of this author is articulated in the 'author contributions' section. The Genomic Health Surveillance Network: Optimization of Assistance and Research in the State of Amazonas – REGESAM is not a funder but a network of researchers in the Genomic field on the State of Amazonas.

**Competing interests:** The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: author Isabela Werneck Cunha IW is affiliated with The Rede D'OR- São Luiz. This does not alter our adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

## Results

The mean age of patients at the time of diagnosis was 57.4 years  $\pm$ SD 17.8 ranging from 20 to 90 years old. Most of the patients (64%) came from rural areas of the Amazonas State. Thirty patients had phimosis (64%). Among the patients with phimosis, 43% (13/30) underwent circumcision, three during childhood and 10 in adulthood. 60% of the patients were smokers or ex-smokers. HPV infection was observed in 45% (21/47) of cases. HPV16 was detected in 13 patients (61%). Other HPV types detected were HPV 6, 11, 42, 51, 53, 68 and 44/55. EBV infection was observed in 30% (14/47) of the patients with PC. Co-infection with HPV and EBV was observed in 28% (6/21) cases. p16<sup>INK4a</sup> was only investigated in 26 samples. The p16<sup>INK4a</sup> overexpression was observed exclusively in HPV 16 positive cases and four HPV negative cases. In the survival analysis, the follow-up time was 35.4 months/patient. The mortality rate during the follow up time was 38%.

## Conclusions

p16<sup>INK4a</sup> positivity presented a high correlation to HPV 16 DNA detection, reinforcing its use as a surrogate marker for HPV-driven cancers. Infection with EBV was quite frequent and its role in epithelial penile oncogenesis needs to be demonstrated.

## Introduction

The occurrence of Penile Cancer (PC) varies worldwide. In developed countries, PC has a low incidence, corresponding to 0.3–1% of malignant neoplasms in men. In some developing countries, the incidence of PC may be much higher than the global average incidence [1–3]. In Brazil, PC accounts for approximately 2.1% of all tumors in men being the highest incidence reported in the Latin America (2.9–6.8 cases per 100,000 men-years) [3]. We can find regional rate differences along the country. In the North and Northeast of Brazil, PC incidence is five times higher compared to the Midwest, South and Southeast regions [4]. According to the Brazilian National Cancer Institute (INCA), the death rate from PC in the northern region of Brazil has doubled in the last decade, from 0.05% to 0.10% [5].

PC is a multifactorial disease and the risk factors and/or favorable conditions to develop PC are not fully established. Phimosis and smegma accumulation are observed in more than 80% of the patients with PC associated with chronic inflammation process [6,7]. Other factors, such as smoking and sexually transmitted infection, are also related to the onset of neoplasms [7,8]. HPV infection is present in approximately 50% of PC cases and the most prevalent genotype is HPV16 (30%) [7,9–11]. A recent meta-analysis study of 52 studies showed a pooled prevalence of 50.8% (44.8–56.7) of HPV infection in PC with a rate of 68.3% (58.9–77.1) of HPV16 [12].

The role played by HPV in carcinogenesis of the penis appears to be similar to cervical cancer. HPV encodes the E6 and E7 oncogenes which are required for malignant transformation and maintenance of host cells. The viral oncoproteins (E6 and E7) may compromise the regulation of the host cell cycle and lead to an uncontrolled proliferation [13,14]. P16 is a tumor suppressor gene and its protein is physiologically expressed in normal tissues. The inactivation of the retinoblastoma gene (pRb) by HPV E7 results in overexpression of p16<sup>INK4a</sup> due to the lack of negative feedback loop between pRb and p16 protein [15]. The overexpression of p16<sup>INK4a</sup> in tumor cells has been shown to correlate with high-risk HPV DNA detection in PC [16].

Epstein-Barr virus (EBV) is another agent associated with PC [17,18]. Inappropriate expression of its latent genes (Latent Membrane Protein) LMP-1, LMP-2A e LMP-2B, involved in cell persistence, may contribute to the development of tumors [19]. EBV is suggested as a viral cofactor rather than a primary carcinogen in Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease, nasopharyngeal carcinoma [17,20]. In HPV-associated cancer, the presence of EBV may also act as a viral cofactor [21]. Several studies have shown the presence of EBV and co-infection with HPV in PC but a relationship between PC and EBV is yet to be established [17,18].

In light of the possible roles of HPV and EBV infection in the development of PC, this study investigated p16<sup>INK4a</sup> expression and HPV and EBV infection in a series of patients with PC from the Brazilian Amazon region.

## Materials and methods

### Enrollment

A total of 47 patients with PC and no concomitant urological neoplastic diseases participating in the study were attended at the public reference cancer center hospital—Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas/FCECON from 2013 to 2018. The patients were followed at the Urology clinic of the hospital. All patients were surgically treated by total or partial penectomy.

All patients provided written informed consent and were interviewed to fill a questionnaire concerning sociodemographic data and risk factors. Histopathology characteristics of the tumors were obtained from the medical charts.

This study was approved by the internal review board of the Ethics Committee of the FCECON—approval document #2.230.007, August 21, 2017. SISGEN- A5F36C5.

### Biological samples collection

At the moment of surgery, three to five mm<sup>3</sup> of tissue fragments (mass of 50-150mg) from the tumor were collected and stored in a dry plastic microtube free of DNase and RNase. Samples were stored at -30 °C until processed.

### DNA extraction

DNA was extracted from the frozen tissue (mass of 20-40mg from different parts of the tumor) using the DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (QIAGEN Inc., USA), according to the manufacturer's recommendations. The DNA was eluted in a volume of 200 µL UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil).

### Human β-globin PCR

For DNA extraction quality control, the human β-globin gene was amplified by PCR as previously described in the literature with the following pair of primers: GH20: (5' GAAGAGC CAAGGACAGGTAC' 3) and PCO4: (5' CAACTTCATCCACGTTCCACC' 3) generating a 270 bp DNA fragment [22].

### HPV detection

All samples were submitted to generic HPV PCR using the consensus primers (PGMY09/11) which amplifies a 450 bp DNA fragment within the L1 region of mucosal HPVs [23]. Amplification was carried out as previously described using 50–100 ng of DNA in 25 µL of reaction mixture and a thermocycling profile of 1 cycle at 5 min at 95 °C, followed by 40 cycles: 1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C, and 1 min at 72 °C, with a final extension for 10 min at 72 °C. The

PCR products (450 bp DNA) were analyzed on 1.5% agarose gel stained with SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil) for visualization of DNA under UV light and 100 bp DNA ladder was used as molecular weight control pattern. Precautions to avoid contamination were followed. DNA from the HeLa cell line which harbors 10–20 copies of integrated HPV 18 per cell was used as a positive control in all reactions.

**E7 HPV16/HPV18 type-specific real-time PCR.** All samples were also submitted to two specific TaqMan based real-time qPCR assays targeting either HPV16/HPV18 E7 gene in an ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). All samples and controls were run in duplicate.

**HPV16-E7.** qPCR assay included the following primers: forward (5' GATGAAATA GATGGTCCAGC3') and reverse (5' GCTTTGTACGCACAACCGAAGC3') primers, and the probe (5' FAM-CAAGCAGAACCGGACAG-MGB-NFQ) in a final reaction volume of 25 µL [24]. Each qPCR reaction contained 1X TaqMan master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 400 nM each of the forward and reverse primers, 200 nM of fluorogenic TaqMan probe, and 50–100 ng of DNA. The amplification conditions consisted of 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 sec, 55 °C for 1 min, and 60 °C for 1 minute. DNA from a SiHa cell line which contains 1–2 copies of integrated HPV 16 per cell was used as a positive control in all reactions.

**HPV18-E7.** qPCR assay included the following primers: forward (5' AAGAAAACGAT GAAATAGATGGA3') and reverse (5' GGCTTCCACCTTACAACACA3') primers, and a probe (5' VIC-AATCATCAACATTTACCAGCC-MGBNFQ3') in a final reaction volume of 25 µL, each qPCR contained 1X TaqMan master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 400 nM each of the forward and reverse primers, 400 nM fluorogenic TaqMan probe, and 50–100 ng of DNA [24]. The amplification conditions consisted of 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 sec, 50 °C for 1 min, and 60 °C for 1 min. DNA from the HeLa cell line which harbors 10–20 copies of integrated HPV 18 per cell was used as a positive control in all reactions.

**HPV genotyping—PapilloCheck® HPV-Screening.** All samples that were positive in generic HPV DNA (PGMY09/11) and negative for 16/18 genotypes were submitted to HPV-Screening Test (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) to identify other genotypes. This is a PCR-based DNA microarray system for detection and identification of 24 HPV genotypes, including 16 high-risk HPV genotypes (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 70, 73, 82), 2 probable high-risk HPV genotypes (HPV 53, 66) and 6 low-risk-HPV genotypes (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44/55) [25].

## EBV detection

EBV DNA detection was performed as described elsewhere [26]. Briefly, a sensitive multiplex PCR which amplifies 182 bp within the Exons 4/5 from the terminal protein RNA of EBV and a fragment of human β-actin 450 bp as internal control. The following pairs of primers for PCR amplification were used: EP5-AACATTGGCAGCAGGTAAGC and EM3 -ACTTAC CAAGTGTCCATAGGAGC for EBV and B-ACT F-TCTACAATGAGCTGCGTGTG and B-ACT R -CATCTCTTGCTCGAAGTC for β-actin. PCR was performed as follows: 1 cycle at 5 min at 95 °C, followed by 10 cycles of 30 sec at 95 °C, 60 sec at 63 °C and subsequently by 30 cycles of 30 sec at 95 °C, 30 sec at 60 °C, and 30 sec at 72 °C, with a final extension for 40 sec at 72 °C. PCR products were analyzed on 1.8% agarose gel stained with SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil) for visualization of DNA under UV light and 100 bp DNA ladder was used as molecular weight control pattern. An EBV positive known sample from the laboratory was used as control.

## Immunohistochemistry for p16<sup>INK4a</sup>

Twenty six samples from PC patients, spotted in tissue microarray were submitted to the immunohistochemistry (IHC) assay for qualitative detection of the p16<sup>INK4a</sup> (21 samples were not available due to pre-analytical factors). IHC assay was performed in an automated system using the Ventana<sup>®</sup> BenchMark Ultra according to the manufacturer's instructions. The IHC slides were analyzed by a pathologist. Positivity for p16<sup>INK4a</sup> was defined as unequivocally nuclear and cytoplasmic staining of at least 70% of the tumor cells [27,28].

## Statistical analysis

Data were compiled using Epi Info™ version: 7.2.2.2 and analyzed using Stata application (v.13, StataCorp, 2013, College Station, Texas, USA). Descriptive analyses were performed using frequency tables. In this study, we analyze independently the relationship between the sociodemographic and clinical profile of patients with PC and three different outcomes: (i) p16<sup>INK4a</sup> overexpression, (ii) HPV infection status and (iii) EBV infection status. Univariate logistic regression models were used to analyze the relationship between these outcomes and sociodemographic and clinical profile of patients with PC and calculate the odds ratios. A *p*-value <0.05 was considered statistically significant.

Those variables that presented an association at a level of significance of 0.2 in the univariate logistic regression were selected to perform the multiple logistic regression. Multiple logistic regression models were used to identify the independent relationships between clinical characteristics of the patients and the studied outcomes. In this manner, adjusted odds ratios were calculated. A *p*-value <0.05 was considered statistically significant.

Kaplan-Meier method was used to determine the differences between survival time of patients stratified by HPV and EBV infection, and with p16<sup>INK4a</sup> overexpression. Groups were compared using the log rank test, taking a *p*-value less than 0.05 as statistically significant.

## Results

HPV and EBV were investigated in tumor tissues from 47 patients with PC, aged 20 to 90 years old (mean 57.4 years ±SD 17.8). Ten patients were below the age of 39 (21%). 64% of the patients came from rural areas of the Amazonas State, 23% from Manaus, the capital city and 13% from other Northern states of Brazil. 79% of the patients with PC were Amerindians descendent (mestizo) and 83% had less than eight years of schooling. 32% of the patients had total penectomy and 68% had partial penectomy. Lymphadenectomy was performed in 13/47 (28%) patients (Table 1).

All cases were diagnosed as squamous cell carcinoma. Of the 47 patients with PC, we were able to review and reclassify only 20 patients according to the 2016 WHO classification [29]. The most common histology subtype was "usual" in 11/20 (55%). We could obtain tumor characteristic from the medical records for only 43 patients. 58% of tumors were located in the glans and foreskin and the predominant pattern of growth was verruciform (48%). Other clinical and pathological parameters can be appreciated in Table 1.

In this study, 36% of the patient had a history of cancer in the family. 60% of the patients were smokers or ex-smokers and 64% had phimosis. 43% were circumcised, mostly in adulthood. 28% of the patients reported a history of sexually transmitted diseases once or several times in their adulthood (Table 2).

The prevalence of HPV is shown in Table 3. HPV DNA was detected in 45% (21/47) of the patients with PC. HPV 16 was the most prevalent genotype 61% (13/21). The other 8 genotypes detected were HPV 6, 11, 42, 51, 53, 68 and 44/55. One patient had multiple co-infections; genotypes 16, 42, 44/55. The distribution of EBV and HPV among the patients with PC is

**Table 1. Sociodemographic characteristics of patients diagnosed with penile cancer at Amazon—Brazil.**

Variables	n	%
<b>Age at diagnosis</b>		
<b>Mean age 57,4 (SD 17.8) (n = 47)</b>		
18–39	10	21
40–59	15	32
> 60	22	47
<b>Ethnicity (n = 47)*</b>		
Caucasians (whites)	6	13
Blacks	2	4
Mestizo	37	79
Indigenous	2	4
<b>Formal education time (n = 47)</b>		
<1 year	10	21
1–8 years	29	62
9–12 years	8	17
>12 years	0	0
<b>Marital status (n = 47)</b>		
Single	9	19
Married	26	56
Widower	10	21
Divorced	2	4
<b>Origin (n = 47)</b>		
Capital city (Manaus)	11	23
Amazonas (interior)	30	64
Other Northern states	6	13
<b>Penectomy type (n = 47)</b>		
Partial	32	68
Total	15	32
<b>Tumor location (n = 43)</b>		
Glans	7	16
Foreskin	1	2
Glans and Foreskin	25	58
Glans, Foreskin and base	7	17
All over the organ	3	7
<b>Predominant gross finding (n = 40)</b>		
Ulcerated	15	37
Verruciform	19	48
Ulcerated and Verruciform	6	15
<b>Tumor subtype (n = 20)</b>		
Basaloid	5	25
Warty	2	10
Cuniculatum	1	5
Sarcomatoid	1	5
Usual	11	55
<b>TNM [30] (n = 32)</b>		
pTx	1	3
pT1 –pT2	18	56
pT3- pT4	13	41

*(Continued)*

**Table 1.** (Continued)

Variables	n	%
<b>Histological grade (n = 33)</b>		
Grade I	4	12
Grade II	19	58
Grade III	10	30
<b>Lymphadenectomy (n = 47)</b>		
Yes	13	28
No	34	72
<b>Metastasis (n = 40)</b>		
Yes	12	29
No	28	71
<b>Follow up (n = 47)</b>		
Dead	18	38
Alive	29	62

\*self-declared; n: Absolute frequency; %: Relative frequency

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232474.t001>

shown in Fig 1. EBV infection was observed in 14 out of 47 patients (30%). Co-infection HPV/EBV was detected in 6 patients, four with HPV 16/EBV and two with HPV 6/EBV and HPV 53/EBV, each. The p16<sup>INK4a</sup> overexpression was observed in three patients with co-infection HPV/EBV, all HPV 16.

Association of p16<sup>INK4a</sup> overexpression with clinical factors and HPV infection status are shown in Table 4. Overexpression of p16<sup>INK4a</sup> was found in 12 cases 46% (12/26). Patients

**Table 2. Risk factors of the 47 patients diagnosed with penile cancer at Amazon—Brazil.**

Risk factors	n	%
<b>Family history of cancer (n = 47)</b>		
Yes	17	36
No	30	64
<b>Smoking History (n = 47)</b>		
Smoking / Ex-Smoking	28	60
No Smoking	19	40
<b>Phimosi s (n = 47)</b>		
Yes	30	64
No	17	36
<b>Postectomy (n = 30)</b>		
Yes	13	43
No	17	57
<b>Time of postectomy (n = 13)</b>		
Childhood	3	23
Adulthood	10	77
<b>Sexually transmitted diseases (n = 47)</b>		
Yes	13	28
No	34	72

n: Absolute frequency; %: Relative frequency

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232474.t002>

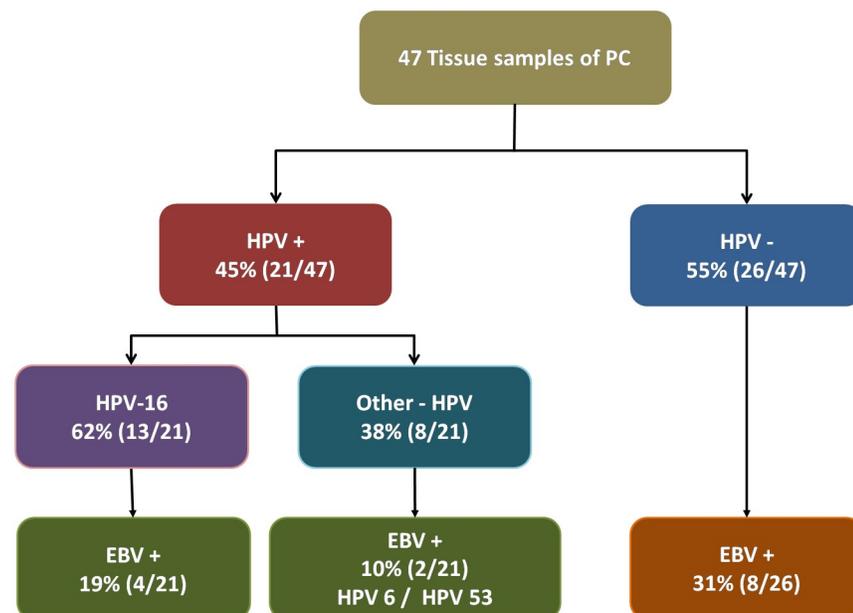
**Table 3. HPV infection prevalence and genotyping at 47 patients diagnosed with penile cancer at Amazon—Brazil.**

Virus infection (n = 47)	n	%
HPV—Positive	21	45
HPV—Negative	26	55
HPV genotyping (N = 21)	n	%
6	1	5
11	1	5
16	13	61
44/55	1	5
51	2	9
53	1	5
68	1	5
16,42,44/55	1	5

n: Absolute frequency; %: Relative frequency

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232474.t003>

with phimosis had 11 times more chance of having overexpression of p16<sup>INK4a</sup> [OR = 11 (95% CI 1.1–109.7);  $p = 0.04$ ]. The p16<sup>INK4a</sup> overexpression was observed in the eight HPV 16 positive cases and in four HPV . Other clinical factors were not significantly associated with HPV infection and p16<sup>INK4a</sup> overexpression. HPV infection and p16<sup>INK4a</sup> overexpression were also related to some histological subtypes, HPV infection being positive in the basaloid subtypes (45%) and negative in usual subtypes (81%) (Table 4). Regarding p16<sup>INK4a</sup> overexpression, of the 11 nonsmokers patients, eight presented over expression of p16<sup>INK4a</sup> while only four patients of the 15 smokers were with p16<sup>INK4a</sup> overexpression [OR = 0.13 (95%CI 0.02–0.780);  $p = 0.026$ ]. Notably, of the eight nonsmoker's patients with p16<sup>INK4a</sup> overexpression, six had



**Fig 1. Distribution of HPV and EBV status among the patients with penile cancer at Amazon—Brazil.** EBV: Epstein-Barr virus; HPV: Human papillomavirus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232474.g001>

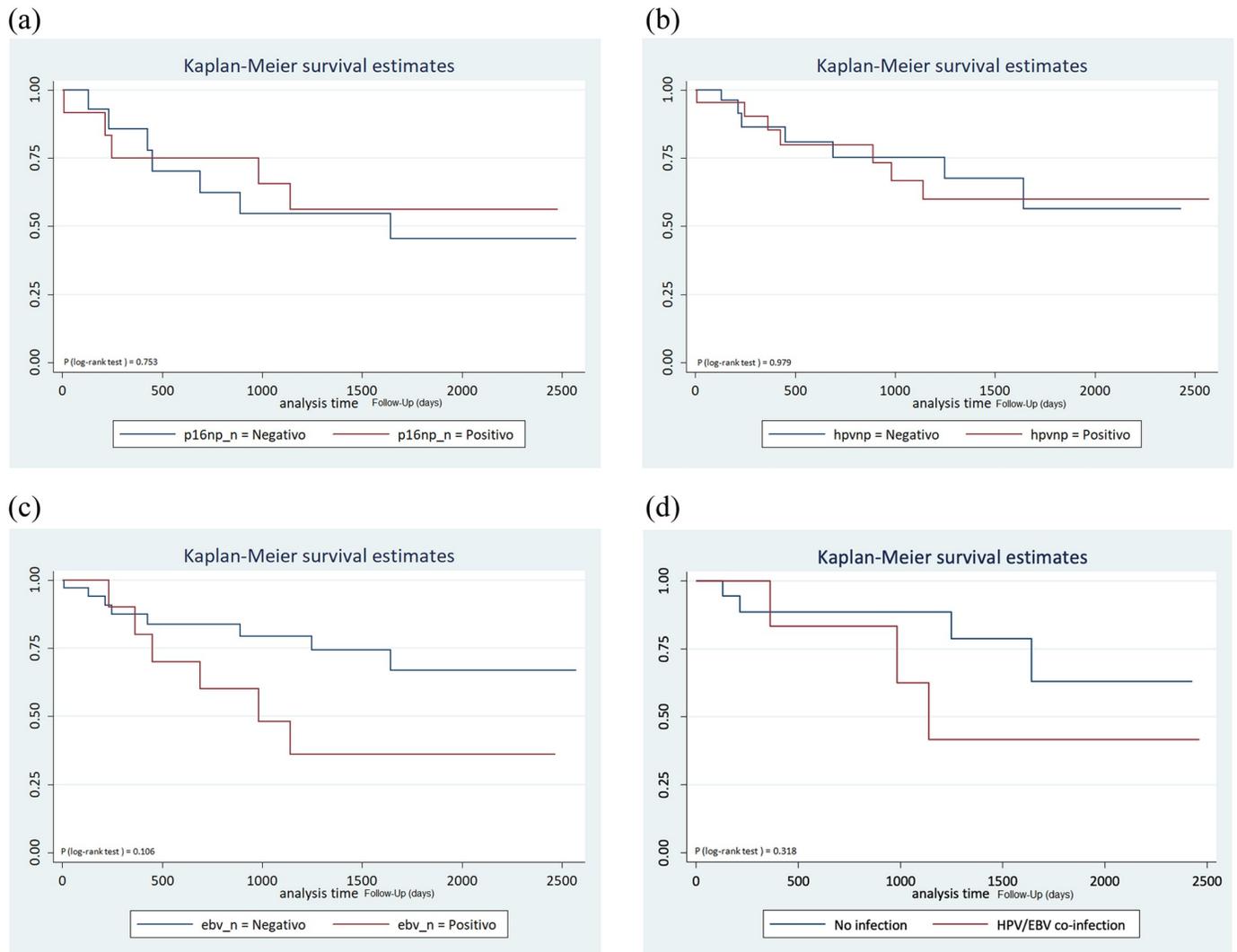
Table 4. Relationship between p16<sup>INK4a</sup> overexpression, HPV infection status, EBV infection status and clinical factors at 47 patients diagnosed with penile cancer.

Variable	p16				HPV				EBV										
	Total	Absent	Present	OR	(95% CI)	P value	Total	Absent	Present	OR	(95% CI)	P value	Total	Absent	Present	OR	(95% CI)	P value	
Age (years)																			
≤ 45	8	5	3				13	8	5				13	9	4				
> 45	18	9	9	0.36	(0.05–2.34)	0.284	34	18	16	1.40	(0.38–5.24)	0.597	34	24	10	0.94	(0.23–3.76)	0.927	
Smoking or Ex Smoking																			
No	11	3	8				19	11	8				19	13	6				
Yes	15	11	4	0.13	(0.02–0.78)	0.026*	28	15	13	1.19	(0.37–3.86)	0.770	28	20	8	0.87	(0.24–3.08)	0.825	
Phimoses																			
No	8	7	1				17	10	7				17	11	6				
Yes	18	7	11	11.0	(1.10–109.67)	0.041*	30	16	14	1.25	(0.38–4.16)	0.716	30	22	8	0.67	(0.18–2.40)	0.535	
Postectomy																			
No	11	5	6				17	9	8				17	13	4				
Yes	7	2	5	2.08	(0.27–15.77)	0.477	13	7	6	0.96	(0.23–4.10)	0.961	13	9	4	1.44	(0.28–7.34)	0.658	
Histological grading																			
Grade I / II	10	4	6				10	2	8				10	6	4				
Grade III/IV	12	6	6	0.66	(0.12–3.63)	0.640	23	18	5	0.07	(0.01–0.46)	0.005*	23	15	8	0.80	(0.17–3.68)	0.775	
Tumor subtype (n = 20)																			
Basaloid	5	0	5				5	0	5				5	4	1				
Warty	2	1	1				2	0	2				2	1	1				
Cuniculatum	1	1	0				1	0	1				1	0	1				
Sarcomatoid	1	0	1				1	0	1				1	1	0				
Usual	10	7	3			0.062	11	9	2			0.009*	11	7	4				0.540
TNM (AJCC, 8 <sup>th</sup> ed.)																			
T1–T2	10	5	5				19	10	9				19	13	6				
T3–T4	11	8	3	0.37	(0.06–2.30)	0.290	13	7	6	0.95	(0.23–3.91)	0.946	13	9	4	0.96	(0.20–4.42)	0.961	
Lymphadenectomy																			
No	16	8	8				34	17	17				34	25	9				
Yes	10	6	4	0.66	(0.13–3.30)	0.619	13	9	4	0.44	(0.11–1.72)	0.190	13	8	5	1.73	(0.44–6.71)	0.424	
Metastase																			
No	16	7	9				29	15	14				29	20	9				
Yes	9	6	3	0.38	(0.07–2.13)	0.250	12	7	5	0.71	(0.19–2.97)	0.700	12	8	4	1.11	(0.26–4.66)	0.886	
Death																			
No	12	7	5				29	17	12				29	22	7				
Yes	14	7	7	0.71	(0.15–3.38)	0.671	18	9	9	1.41	(0.43–4.62)	0.564	18	11	7	2.00	(0.55–7.14)	0.286	
EBV																			
Negative	17	9	8				33	18	15				-	-	-				
Positive	9	5	4	0.9	(0.17–4.56)	0.899	14	8	6	0.90	(0.26–3.17)	0.870	-	-	-	-	-	-	
HPV																			
Negative	11	7	4				-	-	-				26	18	8				
Positive	15	7	8	2.0	(0.40–9.83)	0.394	-	-	-	-	-	-	21	15	6	0.90	(0.25–3.17)	0.870	
HPV Genotype																			
HR-HPV	11	3	8				-	-	-				17	12	5				
LR-HPV	4	4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	3	1	0.80	(0.06–9.66)	0.861	

HPV: Human papillomavirus; HR-HPV: High-oncogenic risk; LR-HPV: Low oncogenic risk; EBV: Epstein-Barr virus; n: Absolute frequency; Odds Ratio (OR) were calculated by logistic regression.

\* statistically significant (p-value < 0.05) and (p-value adjusted < 0.05)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232474.t004>



**Fig 2. The y-axis represents the survival function and x-axis represents the follow-up length in days.** Overall survival depending on p16<sup>INK4a</sup> expression (A), HPV infection status (B), positive and negative for EBV (C) and HPV/EBV co-infection (D). EBV: Epstein-Barr virus; HPV: Human papillomavirus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232474.g002>

HPV 16 genotypes and the remaining two were negative for HPV. Among the four smoker's patients with p16<sup>INK4a</sup> overexpression, two were HPV16 and two negative for HPV. HPV<sup>+</sup> patients with PC had poorly differentiated carcinomas (Grade III) compared to HPV<sup>-</sup> patients with PC [OR = 0.07 95%CI 0.01–0.047;  $p = 0.005$ ].

In the survival analysis, the follow-up time was 35.4 months/patient. The mortality rate during the study period was 38% (18/47). Survival analysis was performed by stratification of the patients into p16<sup>INK4a+</sup> vs p16<sup>INK4a-</sup>, HPV<sup>+</sup> vs HPV<sup>-</sup>, EBV<sup>+</sup> vs EBV<sup>-</sup> and HPV/EBV co-infection vs no infection. Infection status of the deceased and survival patients is shown in S1 Table. There is no evidence of differences in survival of patients according to p16 overexpression ( $P_{\log \text{rank}} = 0.753$ ), HPV infection ( $P_{\log \text{rank}} = 0.979$ ), EBV infection ( $P_{\log \text{rank}} = 0.106$ ) and HPV/EBV co-infection ( $P_{\log \text{rank}} = 0.318$ ) (Fig 2).

1. P16 expression and overall mortality
2. HPV status and overall mortality
3. EBV status and overall mortality
4. HPV/EBV co-infection vs no infection and overall mortality

## Discussion

In the Northern region of Brazil, the mortality rate from PC has doubled in recent years according to INCA [5]. The state of Amazonas, the largest state in Brazil, covers a geographical area of 1,559,168.12 km<sup>2</sup> and has about 4 million inhabitants. Half of the population lives in the capital city, Manaus while the other half is distributed irregularly in the rural regions with low density population with very poor access to health services [31].

The disease affects mainly men between the fifth and seventh decade of life [2,6,32]. In this study, the mean age of the diagnosis of PC was 57.4 years, with a higher prevalence in the age group below 59 years. However, young adults less than 30 years were also diagnosed with PC (9%). Other studies in the country have also reported the early occurrence of PC [4,33–37]. The risk factors and carcinogenesis of PC among young adults is still not established. In this study, young patients were at an advanced stage of the disease. Half of them underwent total penectomy and had metastasis. Of the four young patients, one had co-infection HPV 6/EBV and one HPV 44/55. Two were HPV negative. Interestingly, none of them had high-risk HPV. This may suggest that there are other factors or genetic and molecular changes possibly involved in the development of PC in young adults.

In this study, most of the patients came from the interior of Amazonas and belong to river-side isolated populations with low levels of education and poor access to health services. Besides, they have poor knowledge about the disease and seek diagnosis at an advanced stage. This reality was also observed by Chalya et al. (2015) in Tanzania [38] and in Brazil by other groups [33–35,39,40].

PC usually begins with a superficial or ulcerated lesion on the glans and foreskin, but can also spread through the penile shaft and the scrotum [41]. In the current study, the initial lesion was diagnosed in the glans and/or prepuce in 76% of the cases similar to other studies [4,38,42]. Lesions were predominantly of the verruciform type followed by warts. The accumulation of smegma due to poor hygiene followed by probable irritation of the local is a favorable environment for several infections. Chronic inflammatory processes may progress to the development of lesions and if untreated, can lead to neoplasm [7].

In the present study, 70% (23/33) of the patient showed well and moderately differentiated tumors (Grade I/II) and was not associated with HPV infection (*adjusted p-value* = 0.006). Patients with HPV presented higher grade tumor. Histopathology grade is an important prognostic factor. Degree of poorly differentiated cell could indicate a worse prognosis of lesions. Our findings reinforced other studies observations [43,44].

Phimosis, a well-known risk factor for the development of PC, was present in 64% of the patients. 43% were submitted to circumcision during adulthood. Adult circumcision is known to have no protective effect against the development of PC [45]. The univariate logistic regression showed that patients with phimosis had 11 times more chance of overexpression of p16<sup>INK4a</sup> [OR = 11 (95%CI 1.1–109.7); *p* = 0.04]. Among men circumcised in adulthood, phimosis was strongly associated with development of invasive penile cancer, in concordance with the findings of Daling, et al. (2005) [46].

Of note, the presence of HPV in an individual does not mean that the individual will develop cancer. There are many risk factors that contribute to the development or not such as the environment and the genetic background of the individuals as well as the viral clearance capacity of the individual. PC can be HPV-mediated or not. Individuals HPV<sup>-</sup> with phimosis and chronic inflammation often develop PC. Genetic and molecular changes associated with HPV<sup>-</sup> PC leading to disturbance of the p14<sup>ARF</sup>/MDM2/p53 and/or p16<sup>INK4a</sup>/cyclin D/Rb pathways have been suggested as plausible mechanisms for the development of PC [47]. One study showed that there is silencing of the p16<sup>INK4a</sup> gene through promoter hypermethylation in 15% of cases and over-expression of the polycomb group (PcG) gene BMI-1, which targets the INK4A/ARF locus, encoding both p16<sup>INK4a</sup> and p14<sup>ARF</sup>, in 10% of cases. Another study have suggested that the inactivation of p14<sup>ARF</sup>/MDM2/p53 pathway as well as somatic mutation of the p53 gene and over-expression of MDM2 and mutation of p14<sup>ARF</sup> may lead to the development of PC [48,49].

Emerging interest regarding PC carcinogenesis is the association of oncogenic viruses co-infection. EBV is associated with several malignancies in humans and its involvement in PC is still controversial [50–52]. In this study, the prevalence of EBV was 30% and co-infection with HPV was 29%. Our study differs to the one conducted in Rio de Janeiro where the prevalence of EBV in penile malignancies was 46% and co-infection with HPV was 26% [17]. In cervical cancer, EBV has been suggested as a cofactor that facilitates the integration of the HPV16 genome, contributing to the development of cancer [20,21].

The prevalence of HPV in invasive PC is approximately 45%, ranging from 30% to 75% according to the detection method, the population and type of sample analyzed [11,17,18,40,42,53–55]. High-risk HPV genotype 16 was observed in 61% of HPV<sup>+</sup> cases, reinforcing other studies observations [9,56]. HPV 18, the second most common high-risk HPV [11], was not identified in this study. Low incidence of HPV 18 in PC has also been reported in the country [17,40,42,54]. Of note, the prevalence of HPV 18 is also low in the female population of the Amazonas region [57,58]. Interestingly, in one study of the Thailand population, only 1/65 patients with PC had HPV16 but high presence of HPV18 genotype (55%) was detected [59]. This can probably be explained due to geographical distribution of HPV genotypes.

The occurrence of viral co-infection between HPV genotypes 6, 16, 42, 44/55 and EBV was observed. One patient presented EBV/HPV 6 co-infection. Similar findings, EBV/HPV 6 had been described [18] suggesting a probable viral synergism in tumor development due to their similar tropism of epithelial cells [20,21]. The association of EBV and carcinogenesis is still to be demonstrated with EBV genome or virus gene products within the tumor cell population [60]. HPV 6 is classified as low oncogenic risk and is related to condyloma [61]. However, it is a prominent feature in infections in cases of PC and has multiple co-infections with high-risk types [11,62,63].

The overexpression of p16<sup>INK4a</sup>, a surrogate sensitive marker of HPV in PC [16], still remains to correlate with prognostics [12]. Overexpression of P16<sup>INK4a</sup> was observed in 12 cases (12/26, 46%). 66% (8/12) were from patients infected with HPV 16, reinforcing the role played by HPV16 in the oncogenic process.

Four HPV negative patients showed overexpression of p16<sup>INK4a</sup> (4/12, 33%). Bleeker et al. (2009) in a systematic review, assumes that PC would be related to a pathway mediated by HPV infection and another due to different epigenetic changes in the absence of HPV and related to chronic inflammation [47]. Understanding the molecular processes involved in the onset and progression of the disease is fundamental for the prevention and treatment of this mutilating.

In this series of cases, the mortality rate during the study was 38%. Several studies tried to identify prognostic factors to manage the selection of patients at high risk for metastases in PC [64–68]. HPV infections as well as co-infection with EBV and p16<sup>INK4a</sup> positivity were not predictive of survival of the patients with PC. Lymph node involvement is related to poor prognosis, with a 5-year survival of less than 40% [69,70]. In this study, only 39% of the patients with PC had lymphadenectomy.

Limitations of the study were the difficulties inherent to the non-recording of clinical and histopathological data in medical records. Many biopsy samples fixed in paraffin blocks were missing for the IHC assay for the qualitative detection of the p16<sup>INK4a</sup>, reducing the sample size. In the state of Amazonas, usually patients seek care at an advanced stage of the disease and as soon as they complete their surgical treatment (partial or total penectomy) they return to their city and there is no follow-up.

HPV vaccination has been shown to be effective for HPV-related cancers and inclusion of young in the immunization programs against HPV is well established [71,72]. In the Amazonas, the vaccination program for girls started in 2013 with the quadrivalent vaccine that protects against genotypes 6, 11, 16 and 18. In Brazil, the Ministry of Health only included young males (between 12 and 13 years old) in the vaccination HPV program in 2017. In the future, we expect that this action may reduce the incidence of PC and other HPV-related.

## Conclusions

In summary, our results show that patients with HPV<sup>+</sup> PC have in general low grade tumors. Overexpression of p16<sup>INK4a</sup> was correlated to the detection of HPV 16 DNA, reinforcing that it can be used as a marker to high-risk HPV genotype 16 infection as found in oropharyngeal cancers. EBV infection was observed in one-third of the patients with PC and the co-infection with HPV in a quarter. The knowledge of the etiology of penile cancer is far from definite. The individual role or synergisms of the known oncogenic viruses such as HPV and EBV at the onset of carcinogenic events are still not well defined. However, our data show the profile of these viral oncogenic infections and the reality of this neoplasm in individuals from the Brazilian Amazon.

## Supporting information

### S1 Protocol. HPV detection and genotyping method and EBV detection.

(DOCX)

### S2 Protocol. Immunohistochemical for p16<sup>INK4a</sup> protein.

(DOCX)

**S1 Fig. Patterns of p16 expression in penile carcinomas.** Microarray tissue block immunohistochemistry for p16<sup>INK4a</sup> (from left to right): a. absence; b. strong and diffuse cytoplasmic staining; c. Moderate and focal cytoplasmic staining; d. weak and focal cytoplasmic staining; e. absence of staining; f. strong and diffuse cytoplasmic staining.

(TIF)

**S1 Table. Distribution of HPV, EBV status and p16<sup>INK4a</sup> overexpression among the patients deceased and survived with penile cancer at Amazon—Brazil.** EBV: Epstein-Barr virus; HPV: Human papillomavirus, n: Absolute frequency; +:positive; -:negative.

(DOCX)

### S1 File. Data collection instrument—Penis cancer.

(DOCX)

## Acknowledgments

We thank the Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCE-CON), Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) and A.C. Camargo Cancer Center for the infrastructural support. The authors gratefully acknowledge Dr. Fernando Augusto Soares and Dra. Stephania Martins Bezerra (A.C. Camargo Cancer Center) who performed the Immunohistochemistry for p16<sup>INK4a</sup>, Dr. Marcel Heibel for assistance during the inclusion of patients in the study and Dra. Ana Carolina Soares de Oliveira who performed the HPV Genotyping—PapilloCheck<sup>®</sup> HPV-Screening. The authors would also like to thank the patients that participated in this study.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Valquíria do Carmo Alves Martins, José Eduardo Levi, Kátia Luz Torres.

**Data curation:** Valquíria do Carmo Alves Martins, Giuseppe Figliuolo, Heidy Halanna de Melo Farah Rondon, Paloma Menezes de Souza, Felipe Luz Torres Silva, Guilherme Luz Torres Silva.

**Formal analysis:** Daniel Barros de Castro, Monique Freire Santana.

**Funding acquisition:** Kátia Luz Torres.

**Investigation:** Valquíria do Carmo Alves Martins, Isabela Werneck Cunha, Giuseppe Figliuolo, Heidy Halanna de Melo Farah Rondon, Paloma Menezes de Souza, Felipe Luz Torres Silva, Guilherme Luz Torres Silva, Michele de Souza Bastos, Monique Freire Santana, Kátia Luz Torres.

**Methodology:** Valquíria do Carmo Alves Martins, Isabela Werneck Cunha, Heidy Halanna de Melo Farah Rondon, Michele de Souza Bastos, Rajendranath Ramasawmy, Kátia Luz Torres.

**Project administration:** Valquíria do Carmo Alves Martins, José Eduardo Levi, Kátia Luz Torres.

**Resources:** Kátia Luz Torres.

**Supervision:** Valquíria do Carmo Alves Martins, Kátia Luz Torres.

**Validation:** Isabela Werneck Cunha, José Eduardo Levi.

**Writing – original draft:** Valquíria do Carmo Alves Martins, Isabela Werneck Cunha, Rajendranath Ramasawmy, José Eduardo Levi, Kátia Luz Torres.

**Writing – review & editing:** Valquíria do Carmo Alves Martins, Isabela Werneck Cunha, Rajendranath Ramasawmy, José Eduardo Levi, Kátia Luz Torres.

## References

1. Parkin DM, Ferlay J, Curado MP, Bray F, Edwards B, et al. (2010) Fifty years of cancer incidence: C15 I–IX. *International journal of cancer* 127: 2918–2927. <https://doi.org/10.1002/ijc.25517> PMID: 21351270
2. Christodoulidou M, Sahdev V, Houssein S, Muneer A (2015) Epidemiology of penile cancer. *Current problems in cancer* 39: 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2015.03.010> PMID: 26076979
3. Cardona CEM, García-Perdomo HA (2018) Incidence of penile cancer worldwide: systematic review and meta-analysis. *Revista Panamericana de Salud Pública* 41: e117.

4. Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, et al. (2008) Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. *International braz j urol* 34: 587–593. <https://doi.org/10.1590/s1677-55382008000500007> PMID: 18986562
5. BRASIL. (2019) Ministério da saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/> In: 09/10/2019 A, editor.
6. Pow-Sang MR, Benavente V, Pow-Sang JE, Morante C, Meza L, et al. (2002) Cancer of the penis. *Cancer control* 9: 305–314. <https://doi.org/10.1177/107327480200900405> PMID: 12228756
7. Calmon MF, Tasso Mota M, Vassallo J, Rahal P (2011) Penile carcinoma: risk factors and molecular alterations. *The Scientific World Journal* 11: 269–282. <https://doi.org/10.1100/tsw.2011.24> PMID: 21298218
8. Schabath MB, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Salmerón J, Quiterio M, et al. (2011) Smoking and human papillomavirus (HPV) infection in the HPV in Men (HIM) study. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*.
9. Miralles-Guri C, Bruni L, Cubilla A, Castellsague X, Bosch FX, et al. (2009) HPV prevalence and type distribution in penile carcinoma. *J Clin Pathol*.
10. Stratton KL, Culkin DJ (2016) A Contemporary Review of HPV and Penile Cancer. *Oncology (Williston Park, NY)* 30: 245–249.
11. Alemany L, Cubilla A, Halc G, Kasamatsu E, Quirós B, et al. (2016) Role of human papillomavirus in penile carcinomas worldwide. *Eur Urol* 69: 953–961. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.12.007> PMID: 26762611
12. Olesen TB, Sand FL, Rasmussen CL, Albieri V, Toft BG, et al. (2019) Prevalence of human papillomavirus DNA and p16INK4a in penile cancer and penile intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *The lancet oncology* 20: 145–158. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30682-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30682-X) PMID: 30573285
13. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, De Sanjosé S, Fakhry C, et al. (2016) Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers* 2: 16086. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86> PMID: 27905473
14. Spiess PE, Dhillon J, Baumgarten AS, Johnstone PA, Giuliano AR (2016) Pathophysiological basis of human papillomavirus in penile cancer: key to prevention and delivery of more effective therapies. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66: 481–495.
15. Chipollini J, Chaing S, Azizi M, Kidd LC, Kim P, et al. (2017) Advances in Understanding of Penile Carcinogenesis: The Search for Actionable Targets. *International journal of molecular sciences* 18: 1777.
16. Tang DH, Clark PE, Giannico G, Hameed O, Chang SS, et al. (2015) Lack of P16 ink4a Over Expression in Penile Squamous Cell Carcinoma is Associated with Recurrence after Lymph Node Dissection. *J Urol* 193: 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.08.120> PMID: 25261804
17. Afonso LA, Moyses N, Alves G, Ornellas AA, Passos MR, et al. (2012) Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA in penile cancer cases from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107: 18–23. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000100003> PMID: 22310531
18. Afonso LA, Carestiatto FN, Ornellas AA, Ornellas P, Rocha WM, et al. (2017) Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, and methylation status of p16ink4a in penile cancer. *Journal of medical virology*.
19. de Lima MAP, Rabenhorst SHB (2006) Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. *Revista Brasileira de Cancerologia* 52: 87–96.
20. Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, Kosz-Vnenchak M (2009) Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. *Acta Biochim Pol* 56: 337. PMID: 19499088
21. Guidry J, Scott R (2017) The interaction between human papillomavirus and other viruses. *Virus research* 231: 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.002> PMID: 27826043
22. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, et al. (1985) Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980> PMID: 2999980
23. Gravitt P, Peyton C, Alessi T, Wheeler C, Coutlee F, et al. (2000) Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of clinical microbiology* 38: 357–361. PMID: 10618116
24. Veo CA, Saad SS, Fregnani JHT, Scapulatempo-Neto C, Tsunoda AT, et al. (2015) Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA. *Tumor Biology* 36: 5399–5405. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3205-9> PMID: 25677903
25. Heard I, Cuschieri K, Geraets D, Quint W, Arbyn M (2016) Clinical and analytical performance of the PapilloCheck HPV-Screening assay using the VALGENT framework. *Journal of Clinical Virology* 81: 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.05.004> PMID: 27262102

26. Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N, Plakocefalos E, Tzanakaki G, et al. (2001) Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. *Journal of clinical microbiology* 39: 4426–4432. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.12.4426-4432.2001> PMID: 11724856
27. Bezerra SM, Chaux A, Ball MW, Faraj SF, Munari E, et al. (2015) Human papillomavirus infection and immunohistochemical p16INK4a expression as predictors of outcome in penile squamous cell carcinomas. *Hum Pathol* 46: 532–540. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.12.004> PMID: 25661481
28. Cubilla AL, Lloveras B, Alejo M, Clavero O, Chaux A, et al. (2011) Value of p16INK4a in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: a report of 202 cases. *Am J Surg Pathol* 35: 253–261. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318203cdba> PMID: 21263246
29. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM (2016) The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part A: renal, penile, and testicular tumours. *Eur Urol* 70: 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029> PMID: 26935559
30. Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, et al. (2018) Updates in the eighth edition of the tumor-node-metastasis staging classification for urologic cancers. *Eur Urol* 73: 560–569. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.12.018> PMID: 29325693
31. BRASIL. (2019) Ministério da Economia. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística—IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/am.html> Acesso em: 09/10/2019.
32. Salvioni R, Necchi A, Piva L, Colecchia M, Nicolai N. Penile cancer; 2009. Elsevier. pp. 677–685.
33. Fonseca AGd, Pinto JASdA, Marques MC, Drosdoski FS, Fonseca Neto LORd (2010) Estudo epidemiológico do câncer de pênis no Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 1: 85–90.
34. FIGLIUOLO G, Lima S, Costa S, Silva J, Paiva C, et al. (2015) Perfil clínico-epidemiológico associado a fatores de risco de pacientes com câncer de pênis atendidos em um Hospital de Referência Oncológica em Manaus. Vol. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica* 11.
35. Barros ÉNd Melo MCBd (2009) Câncer de pênis: perfil sócio-demográfico e respostas emocionais à penectomia em pacientes atendidos no Serviço de Psicologia do Hospital de Câncer de Pernambuco. *Revista da SBPH* 12: 99–111.
36. Couto TCd Arruda RMB, Couto MCd Barros FD (2014) Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. *International braz j urol* 40: 738–744. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.06.04> PMID: 25615242
37. de Araujo LA, De Paula AAP, de Paula HdSC, Ramos JEP, de Oliveira BR, et al. (2018) Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in penile carcinoma: Association with clinic pathological factors. *PLoS One* 13: e0199557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199557> PMID: 29949632
38. Chalya PL, Rambau PF, Masalu N, Simbila S (2015) Ten-year surgical experiences with penile cancer at a tertiary care hospital in northwestern Tanzania: a retrospective study of 236 patients. *World journal of surgical oncology* 13: 71. <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0482-0> PMID: 25889238
39. Barbosa AdA Júnior, Athanázio PRF, Oliveira B (1984) Câncer do pênis: estudo da sua patologia geográfica no Estado da Bahia, Brasil. *Revista de saude publica* 18: 429–435. PMID: 6536113
40. de Andrade Martins V, Pinho JD, Junior AALT, Nogueira LR, Silva FF, et al. (2018) P16INK4a expression in patients with penile cancer. *PLoS One* 13: e0205350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205350> PMID: 30312320
41. Mosconi AM, Roila F, Gatta G, Theodore C (2005) Cancer of the penis. *Crit Rev Oncol Hematol* 53: 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.09.006> PMID: 15661566
42. de Sousa IDB, Vidal FCB, Vidal JPCB, de Mello GCF, Nascimento MdDSB, et al. (2015) Prevalence of human papillomavirus in penile malignant tumors: viral genotyping and clinical aspects. *BMC urology* 15: 13. <https://doi.org/10.1186/s12894-015-0007-8> PMID: 25887354
43. Djajadiningrat RS, Horenblas S, Heideman DAM, Sanders J, de Jong J, et al. (2015) Classic and Non-classic HLA Class I Expression in Penile Cancer and Relation to HPV Status and Clinical Outcome. *Journal of Urology* 193: 1245–1251. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.11.057> PMID: 25463996
44. Martínez-Bailón C, Mantilla-Morales A, Méndez-Matías G, Alvarado-Cabrero I, Maldonado-Rodríguez R, et al. (2019) Human papillomavirus genotypes and P16INK4A expression in squamous penile carcinoma in Mexican patients. *BMC Infect Dis* 19: 1–8.
45. Larke NL, Thomas SL, dos Santos Silva I, Weiss HA (2011) Male circumcision and penile cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes & Control* 22: 1097–1110.
46. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, et al. (2005) Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in situ and invasive disease. *International journal of cancer* 116: 606–616. <https://doi.org/10.1002/ijc.21009> PMID: 15825185

47. Bleeker M, Heideman D, Snijders P, Horenblas S, Dillner J, et al. (2009) Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World J Urol* 27: 141–150. <https://doi.org/10.1007/s00345-008-0302-z> PMID: 18607597
48. Ferreux E, Lont AP, Horenblas S, Gallee MP, Raaphorst FM, et al. (2003) Evidence for at least three alternative mechanisms targeting the p16INK4A/cyclin D/Rb pathway in penile carcinoma, one of which is mediated by high-risk human papillomavirus. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 201: 109–118.
49. Soufir N, Queille S, Liboutet M, Thibaudeau O, Bachelier F, et al. (2007) Inactivation of the CDKN2A and the p53 tumour suppressor genes in external genital carcinomas and their precursors. *British Journal of Dermatology* 156: 448–453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07604.x> PMID: 17300232
50. Young LS, Murray PG (2003) Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 22: 5108. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206556> PMID: 12910248
51. Lam KY, Chan AC, Chan KW, Leung ML, Srivastava G (1995) Absence of Epstein-Barr virus in penile carcinoma. A study of 42 cases using in situ hybridization. *Cancer* 76: 658–660. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19950815\)76:4<658::aid-cncr2820760418>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950815)76:4<658::aid-cncr2820760418>3.0.co;2-b) PMID: 8625161
52. Alves G, Macrini CMT, de Souza Nascimento P, Morais JC, Ornellas AA (2004) Detection and expression of Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in tissues from penile tumors in Brazil. *Cancer Lett* 215: 79–82. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.04.025> PMID: 15374635
53. Levi JE, Rahal P, Sarkis AS, Villa L (1998) Human papillomavirus DNA and p53 status in penile carcinomas. *Int J Cancer* 76: 779–783. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19980610\)76:6<779::aid-ijc1>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19980610)76:6<779::aid-ijc1>3.0.co;2-v) PMID: 9626339
54. Scheiner MA, Campos MM, Ornellas AA, Chin EW, Ornellas MH, et al. (2008) Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. *International braz j urol* 34: 467–476. <https://doi.org/10.1590/s1677-55382008000400009> PMID: 18778498
55. Hernandez BY, Goodman MT, Unger ER, Steinau M, Powers A, et al. (2014) Human papillomavirus genotype prevalence in invasive penile cancers from a registry-based United States population. *Frontiers in oncology* 4.
56. Backes DM, Kurman RJ, Pimenta JM, Smith JS (2009) Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. *Cancer Causes & Control* 20: 449–457.
57. SALES L (2015) Caracterização da infecção por hpv em mulheres que realizam exame de rastreio do câncer do colo do útero do município de Manaus. Amazonas: Universidade Federal do Amazonas.
58. Torres KL, Mariño JM, Rocha DAP, de Mello MB, de Melo Farah HH, et al. (2018) Self-sampling coupled to the detection of HPV 16 and 18 E6 protein: A promising option for detection of cervical malignancies in remote areas. *PLoS One* 13: e0201262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201262> PMID: 30036381
59. Senba M, Kumatori A, Fujita S, Jutavijittum P, Yousukh A, et al. (2006) The prevalence of human papillomavirus genotypes in penile cancers from northern Thailand. *Journal of medical virology* 78: 1341–1346. <https://doi.org/10.1002/jmv.20703> PMID: 16927292
60. Young LS, Murray PG (2003) Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 22: 5108–5121. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206556> PMID: 12910248
61. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, et al. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003: 518–527.
62. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, et al. (2001) Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol* 159: 1211–1218. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62506-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62506-0) PMID: 11583947
63. Dorfman S, Cavazza M, Cardozo J (2006) Penile cancer associated with so-called low-risk human papilloma virus. Report of five cases from rural Venezuela. *Tropical doctor* 36: 232–233. <https://doi.org/10.1258/004947506778604896> PMID: 17034702
64. Bezerra SM, Chau A, Ball MW, Faraj SF, Munari E, et al. (2015) Human papillomavirus infection and immunohistochemical p16(INK4a) expression as predictors of outcome in penile squamous cell carcinomas. *Human Pathology* 46: 532–540. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.12.004> PMID: 25661481
65. Zargar-Shoshtari K, Spiess PE, Berglund AE, Sharma P, Powsang JM, et al. (2016) Clinical significance of p53 and p16ink4a status in a contemporary North American Penile Carcinoma Cohort. *Clinical genitourinary cancer* 14: 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2015.12.019> PMID: 26794389
66. Bethune G, Campbell J, Rucker A, Bell D, Rendon R, et al. (2012) Clinical and pathologic factors of prognostic significance in penile squamous cell carcinoma in a North American population. *Urology* 79: 1092–1097. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.12.048> PMID: 22386252

67. Ferrandiz-Pulido C, Hernandez-Losa J, Masferrer E, Vivancos A, Somoza R, et al. (2015) Identification of somatic gene mutations in penile squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 54: 629–637. <https://doi.org/10.1002/gcc.22274> PMID: 26216163
68. Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, et al. (2001) Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer* 91: 2315–2321. PMID: 11413520
69. Micali G, Nasca MR, Innocenzi D, Schwartz RA (2006) Penile cancer. *J Am Acad Dermatol* 54: 369–391; quiz 391–364. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.05.007> PMID: 16488287
70. Reddy JP, Pettaway CA, Levy LB, Pagliaro LC, Tamboli P, et al. (2017) Factors associated with regional recurrence after lymph node dissection for penile squamous cell carcinoma. *Bju international* 119: 591–597. <https://doi.org/10.1111/bju.13686> PMID: 27753187
71. Prue G, Lawler M, Baker P, Warnakulasuriya S (2017) Human papillomavirus (HPV): making the case for 'Immunisation for All'. *Oral diseases* 23: 726–730. <https://doi.org/10.1111/odi.12562> PMID: 27492979
72. Michels KB, zur Hausen H (2009) HPV vaccine for all. *The Lancet* 374: 268–270.

**11.4 Artigo científico 02 - CASES STUDY OF PENILE CANCER NON-HPV/EBV-ASSOCIATED: CLINICAL FACTORS AND VIROME CHARACTERISTICS IN A POPULATION OF THE BRAZILIAN WESTERN AMAZON**

CONFIDENTIAL

1 **CASES STUDY OF PENILE CANCER NON-HPV/EBV-ASSOCIATED:**  
2 **CLINICAL FACTORS AND VIROME CHARACTERISTICS IN A**  
3 **POPULATION OF THE BRAZILIAN WESTERN AMAZON**

4 Valquíria do Carmo Rodrigues Alves\*<sup>1,4,8</sup>, Felipe Luz Torres Silva<sup>4</sup>, Giuseppe Figliuolo<sup>1</sup>, Heidy  
5 Halanna De Melo Farah Rondon<sup>4</sup>, Michelle de Souza Bastos<sup>3</sup>; Felipe Naveca<sup>7,8</sup>, Rajendranath  
6 Ramasawmy<sup>3,5,8</sup>, Maria Galli de Amorim<sup>2</sup>, Emmanuel Dias Neto<sup>2</sup>, Diana Noronha Nunes<sup>2</sup>, José  
7 Eduardo Levi<sup>6</sup>, Kátia Luz Torres<sup>1,4,8</sup>

8 **Affiliations:**

- 9 1. Department of Education and Research, Fundação Centro de Oncologia do Estado do Amazonas, Manaus,  
10 Amazonas, Brazil  
11 2. Medical Genomics Laboratory, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, São Paulo, Brazil  
12 3. Department of Virology, Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas,  
13 Brazil  
14 4. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil  
15 5. Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Manaus, Amazonas, Brazil  
16 6. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil  
17 7. Instituto Leônidas e Maria Deane - Fundação Oswaldo Cruz  
18 8. Genomic Health Surveillance Network: Optimization of Assistance and Research in the State of Amazonas  
19 - REGESAM

20 **\* Corresponding author:**

21 Valquíria do Carmo Alves Martins, MD.

22 Phone: +55 92 3655 4703 or +55 92 98128 6213

23 E-mail: [alvesvalquiria@yahoo.com.br](mailto:alvesvalquiria@yahoo.com.br)

24 Address: Av. Francisco Orellana, 215 – Departamento de ensino e pesquisa

25 Manaus – Amazonas – Brazil ZIP Code: 69040-000

26

27 **Abstract**

28 **Background:** Penile cancer (PC) is a disease with high morbidity and mortality rates,  
29 especially in developing countries. Risk factors include Human Papillomavirus (HPV)  
30 infection, phimosis, zoophilia and poor hygiene. HPV-negative penile carcinogens are  
31 less well understood. **Objectives:** To describe clinical factors and virome characteristics  
32 of patients of the Amazon region diagnosed with penile cancer non-HPV/EBV-  
33 associated. **Methods:** Human Papillomavirus and Epstein Baar Virus DNA obtained  
34 from tumor tissue taken from 47 patients with PC were analysed by PCR. All PC  
35 patients were diagnosed between 2013 and 2018 at a public reference cancer center  
36 hospital in Manaus, Amazonas - Brazil. Thirteen patients with penile cancer non-  
37 HPV/EBV-associated were submitted viral metagenomic analysis by the NetoVIR  
38 (Novel enrichment technique of VIRomes) protocol. **Results:** The mean age of patients  
39 at the time of diagnosis was 52.8 years  $\pm$ SD 17.3 ranging from 20 to 85 years old. Most  
40 of the patients had phimosis and came from rural areas of the Amazonas State (69% and  
41 77%, respectively). Sequencing generated 115G bp with 83% high quality (Q30), and  
42 an average of 28 M pass-filter reads per sample. Bioinformatics analysis of high-  
43 throughput sequencing for virus detection combined two existing workflows which  
44 resulted in a range of 190-2,232 reads ( $< 0.1\%$ ) by Kraken tool and 458,189 – 1,277,735  
45 reads ( $\sim 6\%$ ) by Kaiju – RVDB tool. More than 90% of the viral reads mapped to the  
46 BeAn 58058 virus and Monkeypox virus. Neither of the two virus have been linked to  
47 cancer. Interestingly, between 10-70% of the sequences remained unclassified,  
48 suggesting the potential of high-throughput metagenomic sequencing studies, such as  
49 ours, to identify new microorganisms possibly related to cancer. **Conclusions:** Penile  
50 carcinogenesis has heterogeneous etiology and could be assigned HPV infection or  
51 molecular mechanisms independent of HPV. In this study, 27% (13/47) patients with  
52 penile cancer non-HPV/EBV-associated were analyses by NGS. Most of the DNA  
53 sequencing had been found to represent unclassified sequences. The bioinformatics  
54 analysis showed  $\sim 99\%$  sequences to map against the human genome, it became possible  
55 to assess of multiple genetic alterations and maybe to predict of outcome in penile  
56 cancer.

57 **Key-words:** Penile cancer, Virome, High-throughput sequencing, Amazon.

58

59

60

## 61 **Introduction**

62 Penile cancer (PC) is a disease with high morbidity and mortality rates, especially in  
63 developing countries. Brazil appears among the countries with highest incidence - 2.9 to  
64 6.8 per 100,000 men - particularly in the North and Northeast regions (1). The causes of  
65 PC are multifactorial; an important etiological factor associated with penile  
66 carcinogenesis is the presence of phimosis and smegma accumulation, associated with a  
67 chronic inflammation processes, being observed in more than 80% of patients with PC  
68 (2). Behavioral habits such as smoking and zoophilia may also be associated with penile  
69 cancer (3). In addition to the Human Papillomavirus (HPV) and Epstein Baar Virus  
70 (EBV) infection are also related as a risk factor for penile cancer (4). HPV infection is  
71 present in approximately 50% of PC cases and the most prevalent genotype is HPV 16  
72 (30%) (5, 6).

73 The etiology of penile cancer need still to be better understood. Penile carcinogenesis  
74 can be subdivided into relative HPV and non-relative HPV. The viral oncogenesis of  
75 HPV-related PC is initiated by the viral E6 and E7 oncoproteins expression in host cells.  
76 HPV-negative PC carcinogenesis is poorly understood but has been associated with  
77 several genomic changes such as mutations in TP53 (7-9). In addition, cancers might be  
78 caused by either known or unknown viruses and could therefore be preventable.  
79 Research into gaining a better understanding of the oncogenic pathways for non-HPV-  
80 related PC is necessary.

81 The shotgun metagenomic next generation sequencing permits the identification of  
82 microorganisms in the absence of isolation. This type of approach allows characterizing  
83 all the DNA or RNA present in a sample, enabling the analysis of the entire microbiome

84 (10). The viral metagenomic analysis is an approach for the discovery of new  
85 pathogenic HPVs or other viral agents associated with cancer (11).

86 The aim of the study was to look for novel virus and the relationship between the  
87 clinical profiles of patients with PC “HPV/EBV-negative” from the Brazilian Amazon.

## 88 **Materials and methods**

89 **Study population** – A total of 47 patients with PC included in the study were followed  
90 at the Urology clinic of the public reference cancer center hospital - Fundação Centro de  
91 Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) from 2013 to 2018. All  
92 patients were surgically treated by total or partial penectomy. To characterize the  
93 viroma present in penile cancer samples, initially, laboratory screening for HPV and  
94 EBV oncogenic viruses was performed according to the protocol to Gravitt et al. (2000)  
95 and Markoulatos et al. (2001) (12, 13). The samples have previously been reported in  
96 another study (14). Thirteen samples that were not identified with the presence of HPV  
97 and EBV were analyzed in the viroma metagenomic study. A known HPV 16 and EBV  
98 positive sample was included in the viroma study as a positive control. This sample was  
99 validated by qPCR in all steps.

100 All patients with PC included in the study were interviewed after providing written  
101 informed consent and filled a questionnaire for collecting socio-demographic data and  
102 risk factors. Histopathology characteristics of the tumors were obtained from medical  
103 records of the patient.

104 This study was approved by the internal review board of the Ethics Committee –  
105 FCECON, approval document #2.230.007, August 21, 2017 and SISGEN- A5F36C5.

106 **Sample collection and processing** – At the moment of surgery, three to five  
107 millimeters of tissue fragments from the tumor were collected and stored in a dry plastic  
108 microtube free of DNase and RNase. Samples were stored at -30 °C until processed.  
109 The protocol selected for the viral metagenomic analysis was the Novel Enrichment  
110 Technique of Viromes (NetoVIR) described by Conceição-Neto et al. (2015) (15)  
111 adapted for tumor tissue (16).

112 **Tumor tissue homogenization** - In a crucible with the aid of a scalpel and disposable  
113 forceps, the tissue sample (mass of 50-150 mg) was cut to obtain the tumor fragments.  
114 Homogenization was performed in tubes containing ceramic beads (2.8 mm), which  
115 allow mechanical dissociation of the tissue when the tube is shaken in the Precellys  
116 equipment. 1 mL of sterile Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Saint  
117 Louis, USA) was added to the sample tubes, which were shaken in Precellys at 6,500  
118 rpm 4 times for 15 sec.

119 **Viral Particle Enrichment** - After homogenization, centrifugation was performed at  
120 17,000 g for 3 min to precipitate larger human host cells and particles. All supernatant  
121 was recovered and 500 µl was filtered at 2,000 g for 2 to 10 min, in 0.8 µm filter to  
122 eliminate bacteria. For the digestion of free nucleic acids (outside the viral particles), a  
123 thermomixer nuclease treatment was performed at 37 °C for 2h. Previously, 130 µl of  
124 the filtrate was added 8.4 µl of Buffer 20X (1 M Tris, 100 mM CaCl<sub>2</sub> and 30 mM  
125 MgCl<sub>2</sub>), 1 µl of micrococcal nuclease and 2 µl of benzonase nuclease. To terminate the  
126 enzymatic reaction 7 ul of 0.2 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-  
127 Aldrich, Saint Louis, USA) was added.

128 **DNA / RNA extraction and quantification** - For DNA/RNA extraction, the QIAamp®  
129 Viral RNA Mini Kit (Qiagen, USA) was used according to the manufacturer's

130 recommendations. The final volume obtained was 60  $\mu$ l. Eluted DNA/RNA were  
131 quantified by fluorometry with Qubit RNA HS Assay Kit and Qubit dsDNA HS Assay  
132 Kit (Thermo Fisher, USA).

133 **DNA / RNA Amplification** - DNA/RNA amplification is critical to acquire sufficient  
134 material for sequencing. The Complete Whole Transcriptome Amplification Kit WTA2  
135 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) was used, which is based on reverse transcription of  
136 RNA to cDNA using random oligos containing a universal sequence that is  
137 subsequently used for PCR amplification. 0.5  $\mu$ l Library Synthesis Solution was added  
138 to 2.82  $\mu$ l of the extracted sample (5-25 ng RNA), which was incubated in the  
139 thermocycler for 2 min at 95  $^{\circ}$ C. Followed by, 0.5  $\mu$ l Library Synthesis Buffer, 0.78  $\mu$ l  
140 Nuclease-Free water and 0.4  $\mu$ l Library Synthesis Enzyme were added and incubated in  
141 the thermocycler (18  $^{\circ}$ C for 10 min, 25  $^{\circ}$ C for 10 min, 37  $^{\circ}$ C for 30 min, 42  $^{\circ}$ C for 10  
142 min, 70  $^{\circ}$ C for 20 min and cooling to 4  $^{\circ}$ C). To these 5  $\mu$ l of library was added 7.5  $\mu$ l of  
143 Amplification Mix, 60.2  $\mu$ l of Nuclease-Free water, 1.58  $\mu$ l of WTA dDNTTP mix, 0.75  
144  $\mu$ l of Amplification enzyme, followed by incubation in the thermocycler - 94  $^{\circ}$ C for 2  
145 min, followed by 17 cycles of 94  $^{\circ}$ C for 30 s and 70  $^{\circ}$ C for 5 min, and cooling to 4  $^{\circ}$ C.

146 For the purification of amplified samples, the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen,  
147 USA) was used. 375  $\mu$ l of Buffer PB was added to the 75  $\mu$ l of amplified product,  
148 transferred to the QIAquick column, and centrifuged for 17,900 g for 1 min. The eluate  
149 was then discarded, and the column washed with 750  $\mu$ l Buffer PE. DNA was eluted  
150 from the column with 50  $\mu$ l of Nuclease-Free water. The quantification of DNA in the  
151 sample was performed with a Qubit fluorimeter (Thermo Fisher, USA).

152 **Library Preparation** – 3 ng of the DNA amplified with Nextera XT DNA Library  
153 Preparation Kit (Illumina, USA) was used for library construction. A mix containing 5

154  $\mu\text{l}$  Tagment Buffer, 2.5  $\mu\text{l}$  Amplicon Tagment Mix and 2.5  $\mu\text{l}$  amplified DNA (diluted to  
155 1.2 ng/ $\mu\text{L}$ ) was prepared. This reaction was incubated in the Hybex Microsample  
156 Incubator (SciGene) at 55 °C for 4 min for the tagging process. 2.5  $\mu\text{l}$  of Neutralize  
157 Tagment Buffer was added to suspend the process. Then the components were added:  
158 2.5  $\mu\text{l}$  of primer 1 (i7, different N70X for each sample) 2.5  $\mu\text{l}$  of primer 2 (i5, different  
159 S50X for each sample) and 7.5  $\mu\text{l}$  of Nextera PCR master mix. The reaction was then  
160 incubated in the thermocycler (72 °C for 3 min, 95 °C for 30 s, followed by 15 cycles of  
161 95 °C for 10 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 45 s; followed by 72 °C for 5 min and cooling  
162 to 4 °C).

163 Libraries were purified with AMPure magnetic beads. 15  $\mu\text{l}$  of the magnetic beads were  
164 added to 25  $\mu\text{l}$  of PCR product, which was incubated at room temperature for 5 min and  
165 positioned on the magnetic support for 2 min to attach the beads to the magnet. The  
166 supernatant was removed carefully and discarded, and the beads were washed using 200  
167  $\mu\text{l}$  of 80% ethanol. Ethanol was removed carefully and discarded, and the libraries were  
168 eluted from the beads using 26.25  $\mu\text{l}$  of Resuspension Buffer. After binding of the beads  
169 to the magnet, 25  $\mu\text{l}$  of the supernatant (containing the purified libraries) was transferred  
170 to new tubes. Library concentration was determined by Qubit (Thermo Fisher, USA)  
171 and the size distribution of DNA fragments was determined by Bioanalyzer (~ 250-1000  
172 bp) (Agilent, USA).

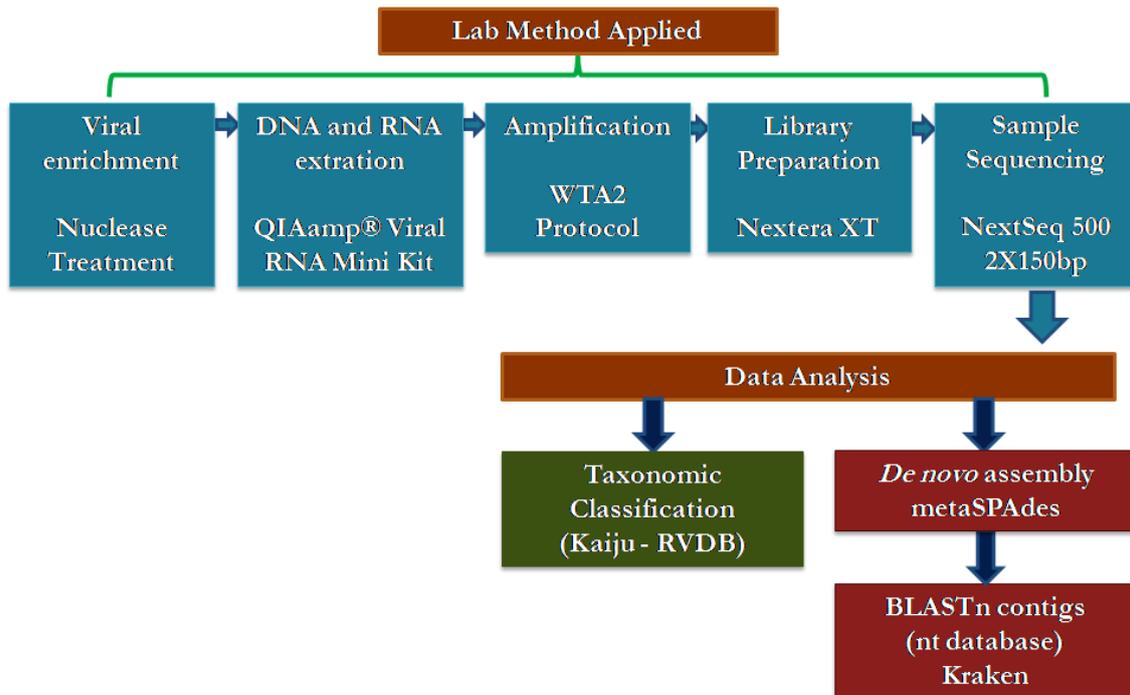
173 Libraries were quantified by qPCR with the KAPA Library Quantification Kit  
174 (Illumina, USA). 1: 500 and 1: 5000 dilutions of the libraries were prepared to be within  
175 the standard curve provided in the Kit. To 4  $\mu\text{l}$  of diluted sample, 6  $\mu\text{l}$  of a 2X KAPA  
176 SYBR FAST qPCR Master Mix/10X Primer Premix / ROX High mixture was added.  
177 The qPCR was performed in StepOne Plus equipment (Thermo Fisher, USA) with the

178 program: 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, and 35 cycles of 60  
179 °C for 45 s. Each library was diluted to a concentration of 4 nM using the concentration  
180 obtained in qPCR and the average size obtained in Bioanalyzer. An equimolar mixture  
181 of the libraries was then prepared for sequencing.

182 **Sample Sequencing** - Sequencing was performed on the NextSeq 500 platform  
183 (Illumina, USA) with 150 bp pair-end reading using the High-output flow cell, with  
184 expected capacity to generate up to 400 million sequences. We were hoping to get about  
185 20 million readings per sample with this number of sequences, a coverage that seems  
186 adequate for a first assessment.

187 **Bioinformatics pipeline for pathogen detection** - Bioinformatic analysis was done by  
188 two pipelines: *De novo* assembly of reads was performed with metaSPAdes (17), and  
189 contigs were mapped with Kraken (18) against NCBI nt database, which contains  
190 sequences from all known eukaryotes, bacteria and viruses. In addition, subsequently  
191 taxonomically classified with the Kaiju (Version 1.7.2 2019-07-12) classifier using the  
192 Reference Viral database (RVDB) containing viral, virus-like and virus related  
193 sequences was performed (19, 20). The laboratory methods and analysis pipeline  
194 workflow are shown in the figure 1.

195 **Statistical Analysis** - The data were organized in a database using Epi-Info version  
196 7.2.1 / 2017 (CDC, Atlanta, Georgia, USA), which was also used for descriptive  
197 statistical analysis of the data.



198

199 **Fig 1:** Laboratory methods and analysis pipeline workflow

200 **Results**

201 Thirteen samples of patients with penile cancer non-HPV/EBV-associated were  
 202 included in this study. The median age for patients with CP was 52.8 years old, the  
 203 youngest was 20 years old, diagnosed at an advanced stage. Most of the patients (77%)  
 204 came from rural areas of Amazon State. 54% of the patients were smokers or ex-  
 205 smokers and 69% had phimosis. Just four patients with PC were circumcised, mostly in  
 206 adulthood. Another clinic pathological characteristic is shown in Table 1.

207 The tissue from penile cancer specimens were submitted to shotgun metagenomic to  
 208 analyze both DNA and RNA microbial material. The samples were amplified using  
 209 sequenced pair-end 150 bp on NextSeq 500 with High-output flow cell (Illumina).  
 210 Sequencing generated 115G bp with 83% high quality (Q30), and an average of 28 M  
 211 pass-filter reads per sample.

212 Table 2 provides the performance analysis of high-throughput sequencing data of using  
213 the bioinformatics pipeline for pathogen identification *De novo* assembly of reads with  
214 metaSPAdes, and contigs were mapped with Kraken against NCBI nt database. Median  
215 sequencing depth was 23,282,629 (range: 13,377,544 – 38,346,336) reads per sample.  
216 Unclassified reads accounted for 7,498,734 (range: 4,252,120 – 11,534,573), followed  
217 by Bacteria and Archaea 22,272 (range: 7,029-39,311), Eukaryota 15,760,870 (range:  
218 9,112,912– 26,946,721) and viruses 752 (range: 190-2,232). Less than 0.1% of the total  
219 reads were mapped to viruses and 90% of viral reads were mapped to the BeAn 58058  
220 virus and to the viral families *Myoviridae* (Supplemental Information - Figure S1.).

221

222

223

224

225

226

227

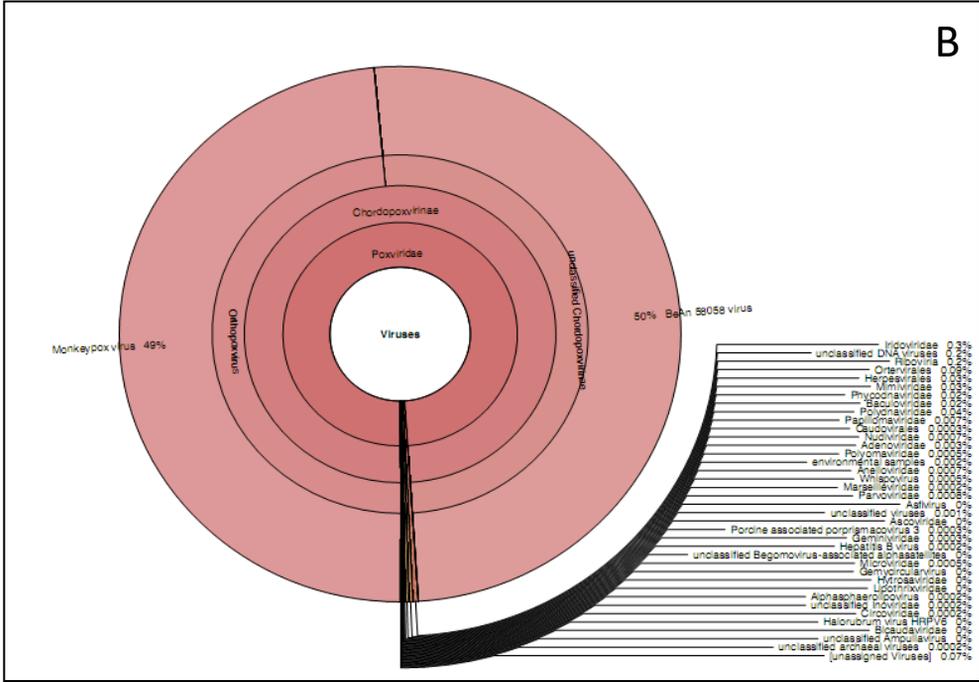
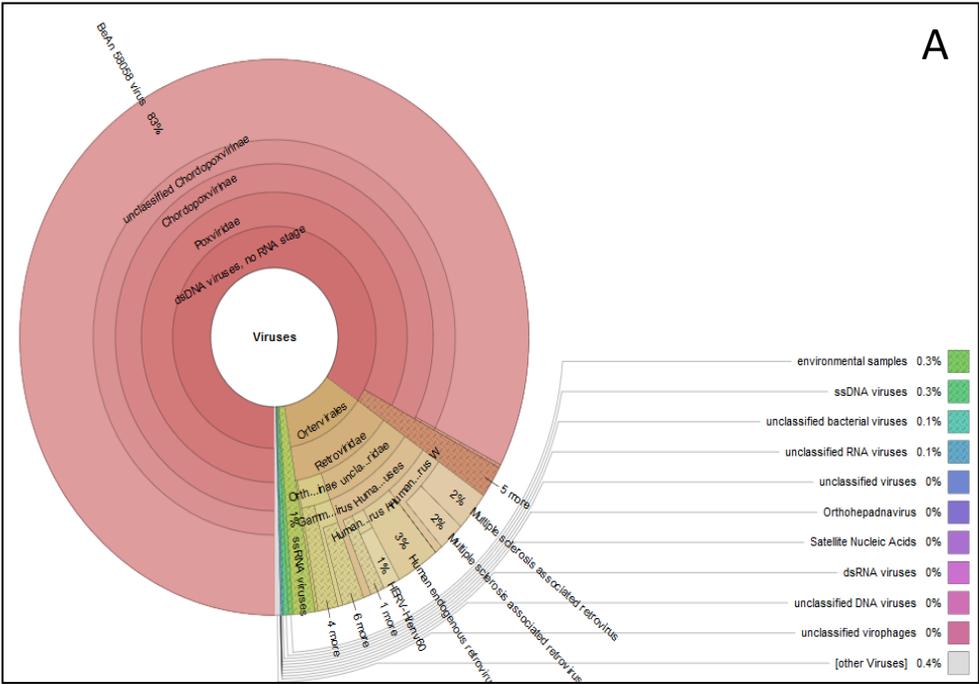
## Supplemental Information

CASES STUDY OF PENILE CANCER NON-HPV/EBV-ASSOCIATED: CLINICAL FACTORS AND VIROME CHARACTERISTICS IN A POPULATION OF THE BRAZILIAN WESTERN AMAZON

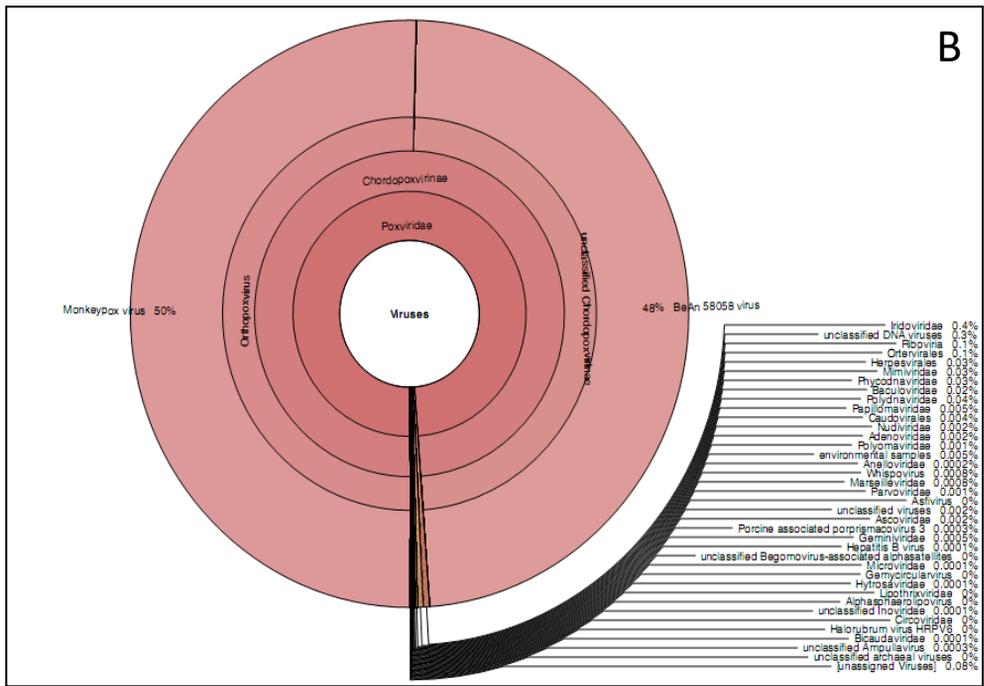
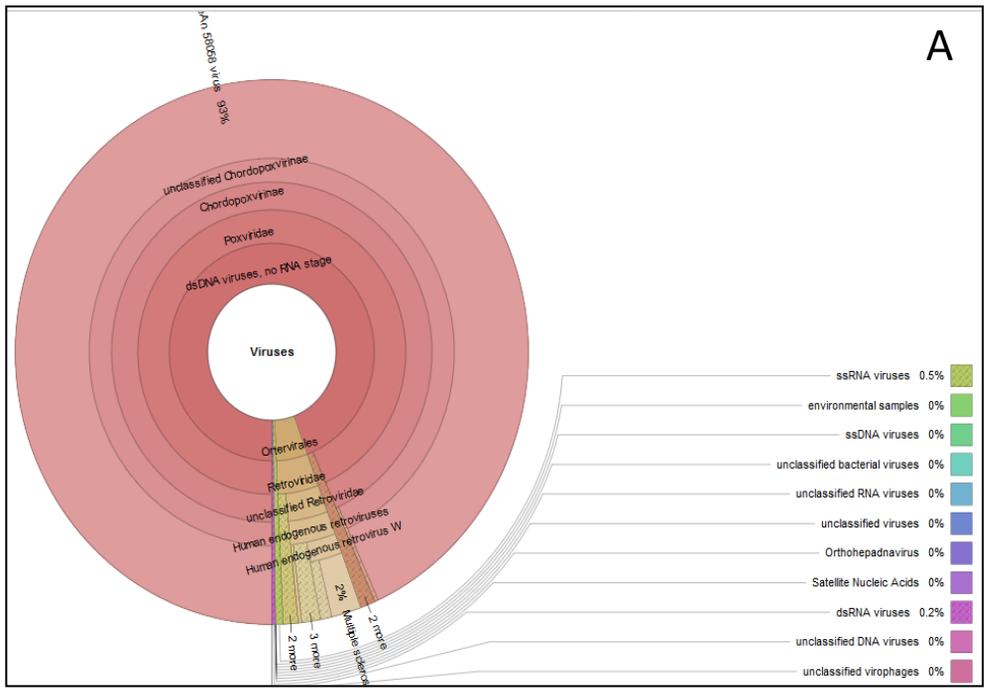
Valquíria do Carmo Rodrigues Alves, Felipe Luz Torres Silva, Giuseppe Figliuolo, Heidy Halanna De Melo Farah Rondon, Michelle de Souza Bastos, Felipe Naveca, Rajendranath Ramasawmy, Maria Galli de Amorim, Emmanuel Dias Neto, Diana Noronha Nunes, José Eduardo Levi, Kátia Luz Torres

**Figure S1.** Graphics result bioinformatics analysis. **A:** mapped with Kraken (v2) and **B:** Taxonomically classified with the Kaiju (Version 1.7.2 2019-07-12) classifier using the Reference Viral database (RVDB)

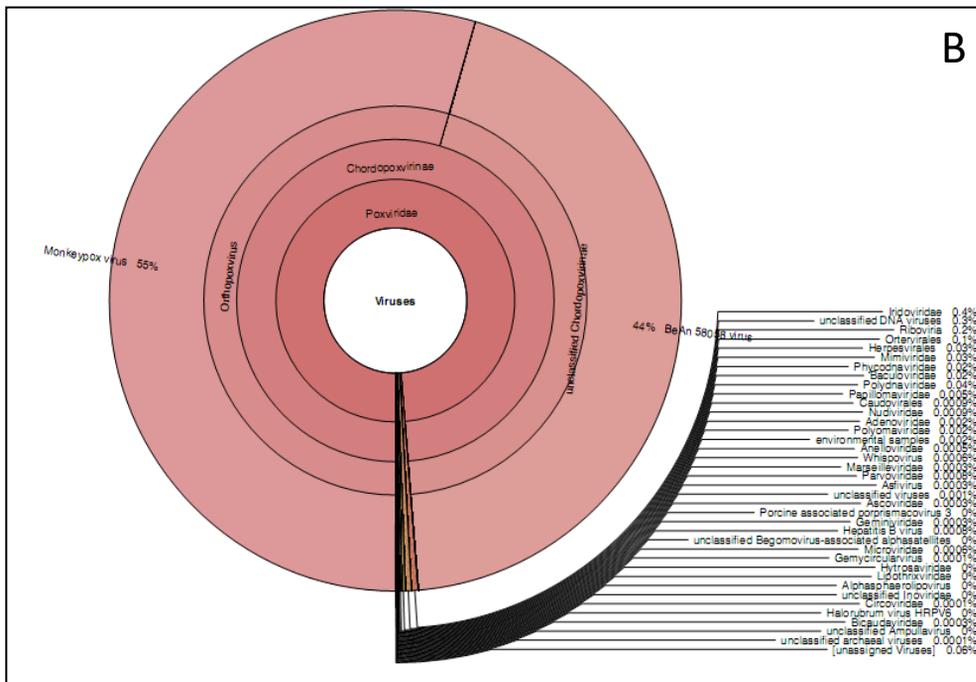
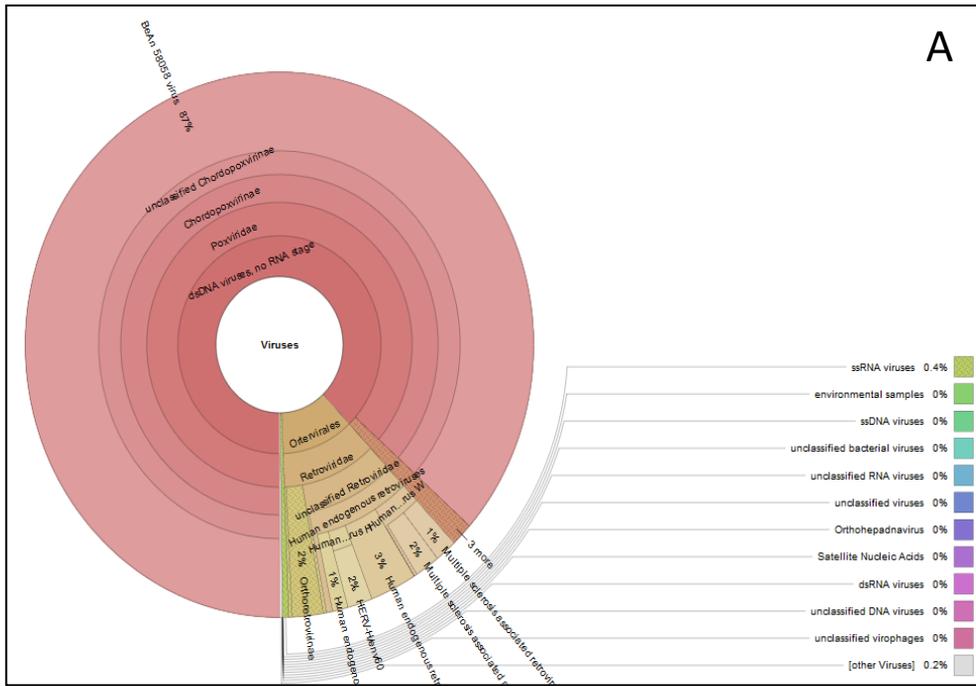
# Sample 1-30



# Sample 2-32



# Sample 3-41

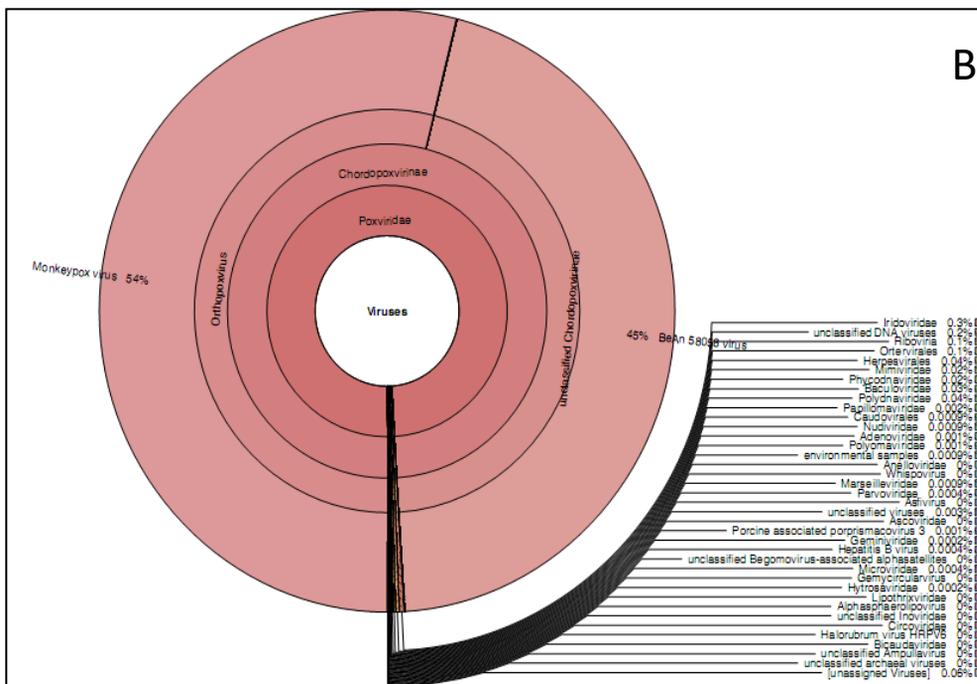
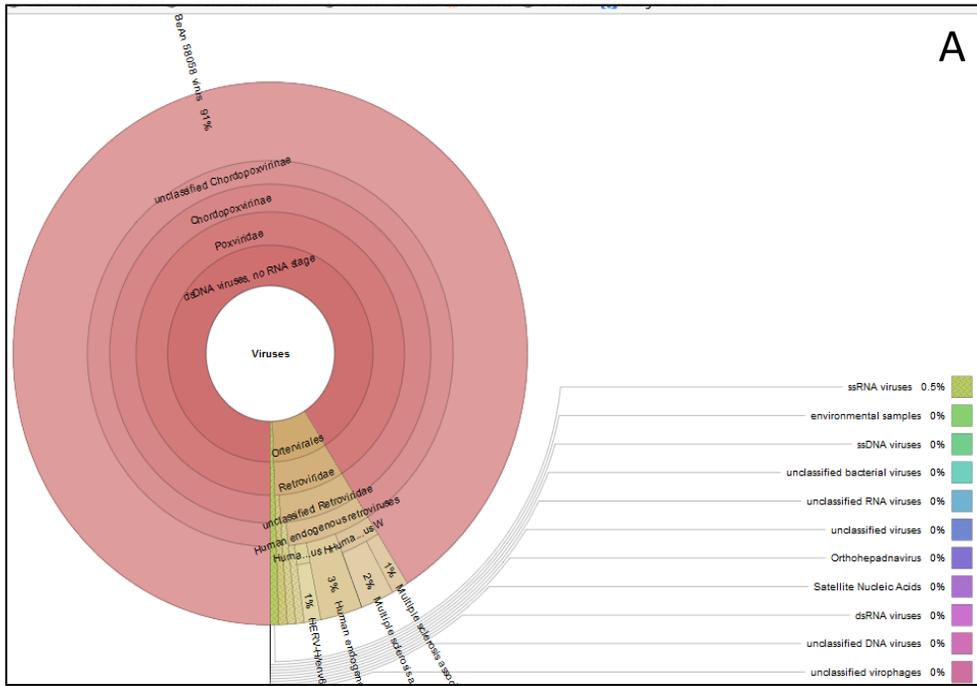




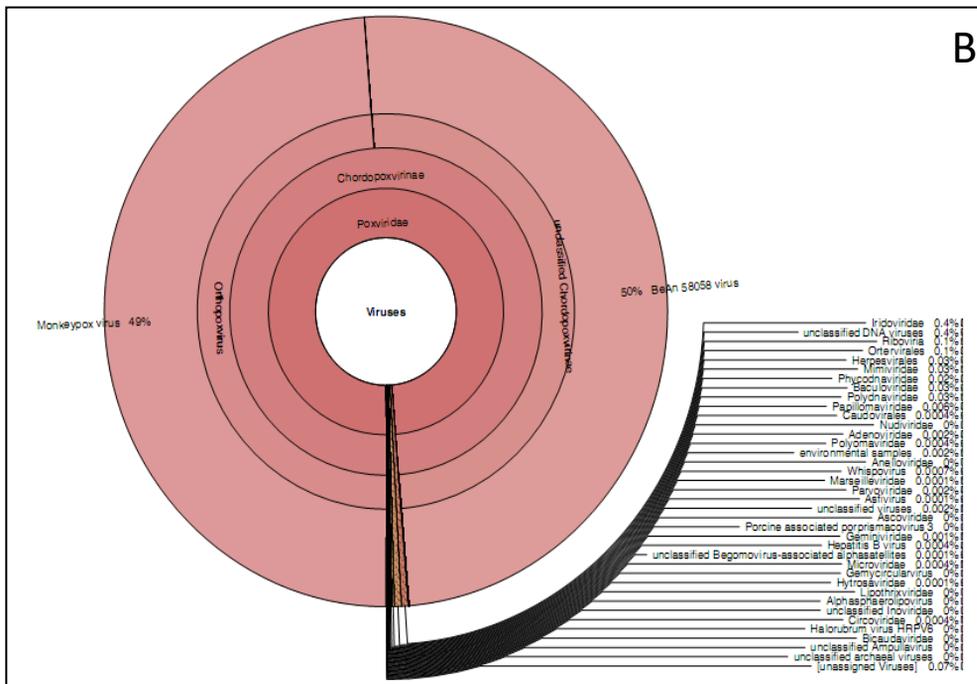
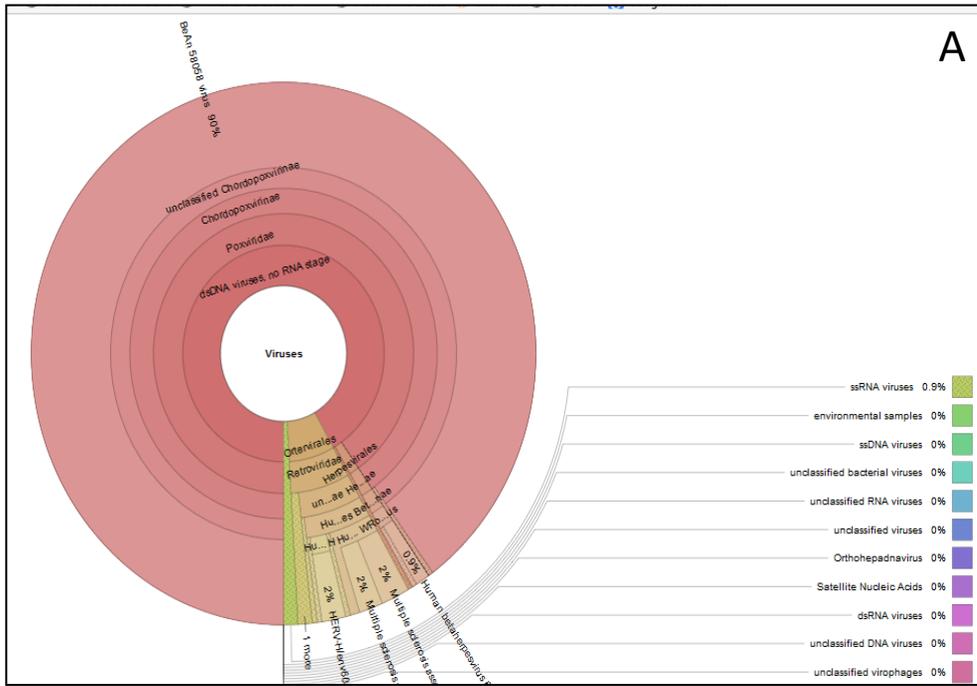




# Sample 7-51

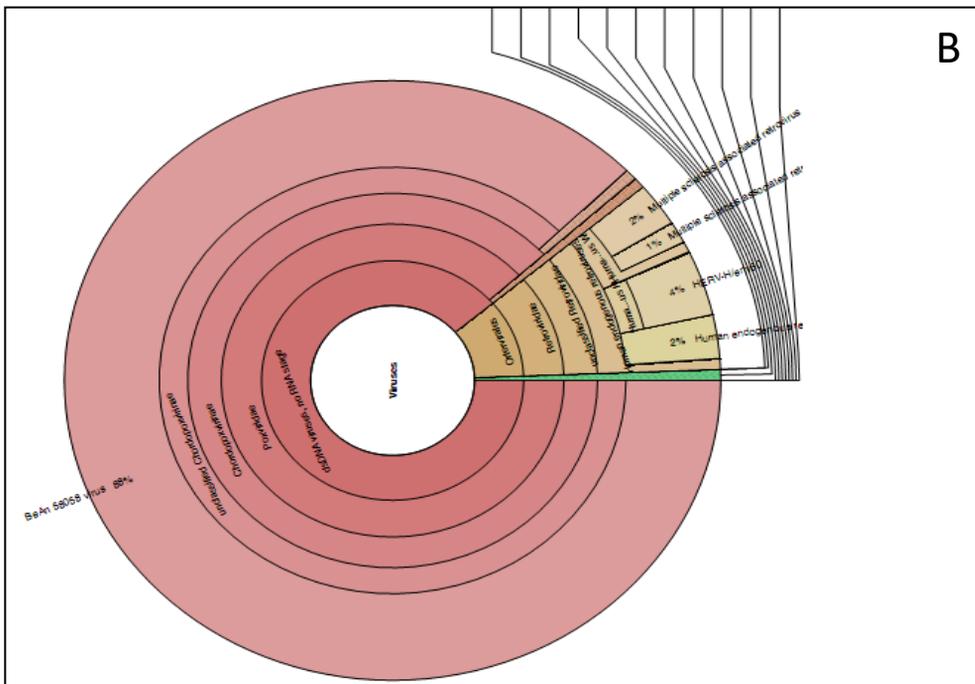
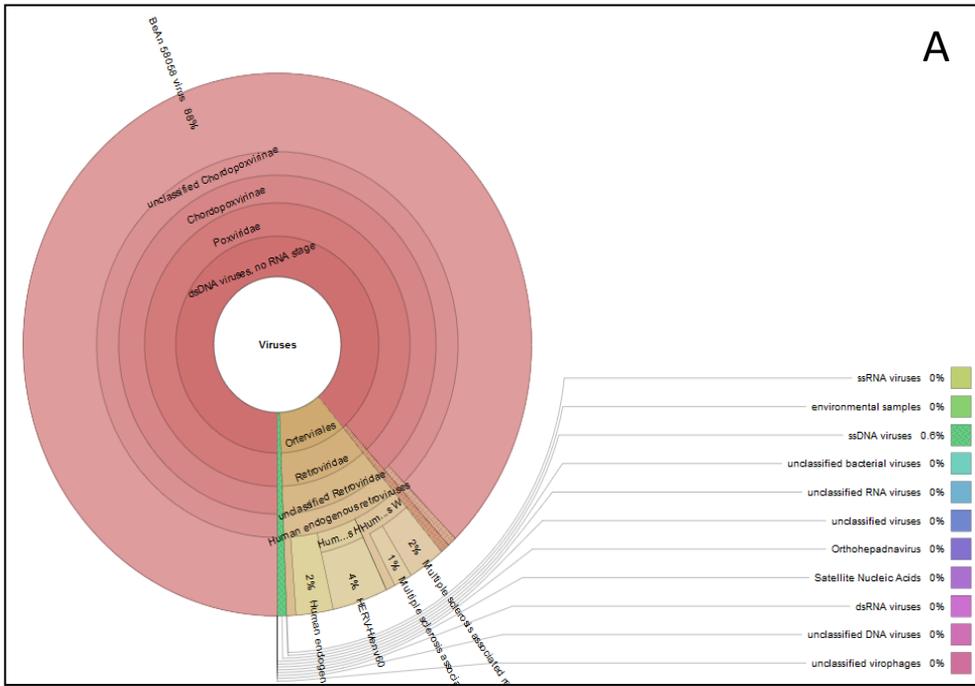


# Sample 8-55



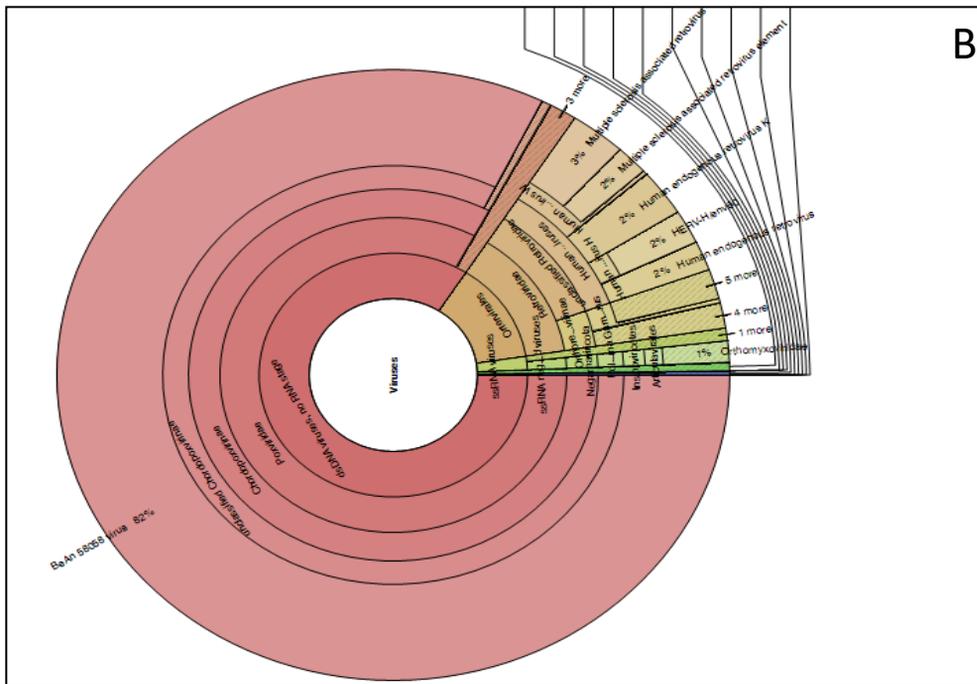
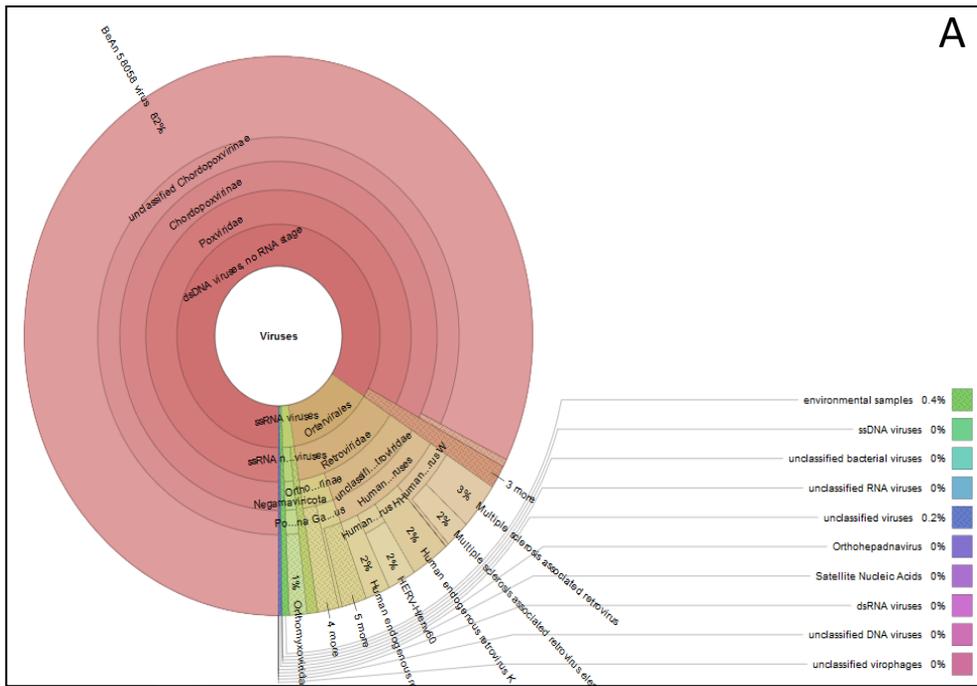


# Sample 10-62





# Sample 12-74



# Sample 13-75

