

2.02.02 - Genética / Genética Molecular e de Microorganismos.

IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS PATÓGENOS EM UMA ANÁLISE METAGENÔMICA DE SÊMEN HUMANO.

Beatriz H. D. Rodrigues de Albuquerque^{1*}, Maryana T. F. Câmara de Oliveira¹, Janaina F. Aderaldo², Daniel C. F. Lanza³

1. Estudante da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)
2. Pesquisadora da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)
3. Professor da UFRN - Departamento de Bioquímica/Orientador

Resumo

A infertilidade afeta cerca de 15% dos casais em idade fértil em todo o mundo, sendo o fator masculino responsável por 50% dos casos em geral. Nesse cenário, as condições infecciosas caracterizam-se como importantes fatores etiológicos. Assim, este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar potenciais patógenos no sêmen de pacientes em tratamento de reprodução assistida, através de uma abordagem metagenômica *shotgun* e análise dos dados por *softwares* específicos. Os resultados obtidos mostraram uma prevalência de bactérias, com a identificação de 120 espécies e 25 gêneros. Também foram identificadas 5 espécies virais, 2 espécies de protozoários, 2 espécies fúngicas e 1 espécie de helminto, sendo alguns desses patógenos achados inéditos no sêmen humano. Dessa forma, foi possível concluir que o ambiente seminal não é estéril, mas que o seu microbioma é composto por diferentes microrganismos que, por sua vez, podem exercer efeitos consideráveis sobre a fertilidade masculina.

Autorização legal: 3.043.526

Palavras-chave: Reprodução assistida; microbioma seminal; infertilidade masculina

Apoio financeiro: CNPq, UFRN, Ebserh

Trabalho selecionado para a JNIC: UFRN

Introdução

A infertilidade afeta cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva em todo o mundo e é definida como a falha em conceber após 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas (WHO, 2000). Nesse cenário, a infertilidade do fator masculino é atribuível em até 50% dos casos, e as causas potenciais incluem infecções do trato urogenital (BORGHT et al., 2018; PILATZ et al., 2016). Essas infecções podem impactar a saúde reprodutiva masculina através de múltiplos mecanismos fisiopatológicos, envolvendo o comprometimento dos parâmetros seminais e a função dos espermatozoides (GIMENES et al., 2014). Dessa forma, o estudo do microbioma seminal, composto pelo material genético da comunidade microbiana do sêmen (por exemplo, bactérias, fungos e vírus), é de suma importância para compreender o seu papel na fertilidade do fator masculino.

No entanto, a investigação desses organismos baseia-se principalmente em métodos tradicionais, como cultura bacteriana, imunoenaios enzimáticos, imunofluorescência e microscopia. Contudo, nos últimos anos, métodos de diagnóstico mais sensíveis e específicos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) tornaram-se disponíveis, e tem auxiliado para melhorar a compreensão da relação entre infertilidade e infecções seminais (GIMENES et al., 2014). Da mesma forma, o advento da metagenômica, que compreende o processo de sequenciamento e análise dos fragmentos de DNA presentes em uma amostra (HUGENHOLTZ et al., 2008), tem permitido a caracterização mais precisa do microbioma humano e a análise de sequências em larga escala. Assim, enquanto a maioria dos ensaios moleculares visa apenas um número limitado de patógenos, as abordagens metagenômicas permitem a análise de todo o microbioma.

Diante disso, este estudo teve por objetivo analisar o metagenoma obtido a partir de amostras de sêmen de pacientes submetidos a procedimentos de reprodução assistida, com o intuito de prospectar sequências e informações para identificar e caracterizar o material genético de potenciais microrganismos, permitindo assim uma análise mais abrangente do microbioma seminal. Essa análise será importante para auxiliar o desenvolvimento de protocolos moleculares que facilitem o diagnóstico dos principais patógenos de importância clínica.

Metodologia

Um total de 50 amostras de sêmen foram coletadas de pacientes do Centro de Reprodução Assistida, da Maternidade Escola Januário Cicco (CRA-MEJC) e mantidas em nitrogênio líquido até serem encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada (LAPLIC), onde foram analisadas e armazenadas a -20°C . Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, desenvolvido para os propósitos deste estudo.

Para o ensaio metagenômico, um volume de 200 μL de sêmen de cada amostra foi utilizado para a obtenção de um *pool* único com todos os espécimes clínicos. Dessa forma, 1 mL do *pool* foi centrifugado a 5.000 rpm por 3 minutos e o precipitado obtido foi diretamente utilizado para a extração de DNA com o *kit* PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O sucesso da extração foi observado pela quantificação do DNA extraído, realizada por fluorimetria através do Quantus™ Fluorometer (Promega), que indicou uma concentração igual a 123 ng/ μL . A amostra de DNA foi então encaminhada para o Núcleo de Genômica (NUGEN) do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG) e submetida ao sequenciamento *shotgun* realizado em um sistema Ion Torrent (Ion PGM), utilizando um *chip* Ion PGM 318, no qual foram priorizados os fragmentos com 400 pb.

Os dados do sequenciamento (*reads* brutas) foram processados para remoção de bases de baixa qualidade. Para isso, as bases com qualidade PHRED inferior a 20, foram removidas pelo pré-processador Fastp (CHEN et al., 2018) e o programa FASTQC (ANDREWS et al., 2010) foi utilizado para comparar a qualidade das *reads* antes e depois desta etapa. Da mesma forma, as duplicatas das *reads* aparadas foram removidas pelo pacote *fastx_collapser* da coleção de ferramentas FASTX-Toolkit.

Na fase de caracterização taxonômica, as *reads* processadas foram alinhadas no BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) versão 2.9.0, contra o banco de dados de nucleotídeos não redundantes (nt) do Genbank, no modo padrão, com um valor de corte e-value de $1e^{-5}$. Os dados do BLASTn foram processados pelo *software* KRONA (ONDOV et al., 2011), gerando a visualização dos resultados de forma hierárquica em um gráfico interativo, com os seus respectivos valores médios do log e-value (levm). O levm e o número de *reads* alinhadas (*reads* com *hits*) foram utilizados para selecionar os resultados que apresentaram uma menor probabilidade de ocorrência ao acaso e analisar os patógenos mais abundantes, respectivamente.

Resultados e Discussão

Os resultados do sequenciamento geraram 4.000.000 *reads* brutas em formato FASTQ. Após o processamento, 3.968.949 *reads* foram selecionadas e alinhadas, resultando em 3.958.949 *hits*, com 9.336 *reads* que não receberam uma atribuição taxonômica pelo KRONA. Entre os *hits* obtidos, os mais abundantes pertenceram a Eucariotos ($n=3.947.849$; levm= -124.85), seguido por Bactérias ($n= 948$; levm= -105.289), Sequências Artificiais ($n= 793$; levm= -136.799), Vírus ($n=19$; levm= -124.243) e Sequências não Classificadas ($n= 4$; levm= -95.7569). Devido ao *background* do hospedeiro humano, a maioria dos *hits* foram atribuídos à espécie *Homo sapiens* ($n= 3.837.388$; levm= -125.929).

Dessa forma, a abordagem metagenômica realizada possibilitou uma melhor análise das comunidades microbianas no sêmen humano e indicou uma maior abundância de bactérias em relação a vírus e outros patógenos. Entretanto, os bancos de dados públicos de genomas relacionados a vírus estão incompletos com muitas sequências rotuladas como “desconhecidas”, o que limite a identificação desses organismos (BZHALAVA et al., 2012) e pode explicar a diferença observada entre o número de *hits*.

Além disso, como a maioria das *reads* (97%) foram derivadas do material genético humano, a sensibilidade analítica geral da abordagem para detecção de patógenos foi limitada, dada a escassez relativa das *reads* microbianas que foram sequenciadas. Porém, essa limitação não é totalmente negativa, tendo em vista que a presença do DNA humano possibilitou a identificação de sequências microbianas inseridas no genoma do hospedeiro.

Caracterização taxonômica das sequências virais

Em vírus, foram identificados 19 *hits*, sendo 13 correspondentes aos retrovírus endógenos humanos (HERVs), incluindo o retrovírus endógeno humano K (HERV-K) ($n=7$; levm = -139.635) e H (HERV-H) ($n=6$; levm= -105.048). Outros 5 *hits* foram classificados como vírus da subfamília *Betaherpesvirinae*, incluindo os gêneros *Roseolovirus* ($n=3$; levm = -129.637) e *Cytomegalovirus* ($n=2$; levm = -121.053) e, o *hit* restante, ao Papilomavírus humano 16 (HPV-16) (levm= -121. 876).

Os HERVs não são achados incomuns, uma vez que, representam cerca de 8% do genoma humano e estão amplamente distribuídos pelo DNA do hospedeiro (LANDER et al., 2001). Entretanto, a relação desses provírus com a fertilidade masculina ainda não foi elucidada. Contudo, KAMP et al. (2000), sugeriram que alguns HERVs estão correlacionados com a esterilidade masculina, visto que, podem ocasionar um tipo de microdeleção no cromossomo Y relacionada a uma das causas de azoospermia.

Por outro lado, o herpesvírus humanos 6 (HHV-6) classificado dentro do gênero *Roseolovirus*, é frequentemente encontrado em amostras de sêmen (NEOFYTOU et al., 2009), mas o seu impacto na fertilidade masculina ainda não está claro. Já o citomegalovírus humano (HCMV), pertencente ao gênero *Cytomegalovirus*, tem um potencial efeito citotóxico direto em espermatozoides e células germinativas imaturas (NAUMENKO et

al.,2011). Da mesma forma, o HPV também é capaz de causar efeitos prejudiciais nos parâmetros seminais, incluindo baixa capacidade para fertilização, contagem anormal, produção de anticorpos anti-espermatozoides e, em particular, redução da motilidade (YANG et al.,2013), o que sugere que a infecção por HPV é um fator de risco para a infertilidade masculina.

Caracterização taxonômica das seqüências de protozoários

Em protozoários, o filo *Apicomplexa* foi o único identificado, recebendo 7 *hits* (levm= -35.9922), sendo 5 *hits* relativas à espécie *Toxoplasma gondii* (levm = - 36.6601) e 2 *hits* ao *Plasmodium vivax* (levm = - 34.3226). Esses resultados são bastante relevantes, tendo em vista que protozoários ainda não foram descritos no sêmen humano.

No entanto, TERPSIDIS et al. (2009) descobriram que a motilidade e a concentração espermática foram significativamente reduzidas em ratos cronicamente infectados com *T. gondii* em comparação com os controles, indicando que esse protozoário pode causar alterações na função reprodutiva. Da mesma forma, em relação ao *P. vivax*, sabe-se que a febre aguda na malária pode alterar a temperatura ideal para a produção de espermatozoides (THONNEAU et al. 1998). Além disso, SINGER et al. (1987) observaram que a malária também pode diminuir a qualidade do sêmen e causar oligozoospermia, necrozoospermia ou azoospermia graves em homens.

Caracterização taxonômica das seqüências de fungos e helmintos

Para os fungos, foram identificados 3 *hits*, sendo 2 atribuídos à espécie *Malassezia globosa* (levm = - 43.1642), que compõe parte da microbiota da região genital masculina (MAYSER et al., 2001), e a restante a *Meliniomyces* não cultiváveis (levm = -5.50585), uma espécie isolada em raízes de plantas ericáceas.

Em relação aos helmintos, 8357 *hits* foram relativos à espécie *Spirometra erinaceieuropaei* (levm= - 71,0043), um tipo de tênia raramente detectada em humanos, mas que é capaz de causar esparganose (JEON et al., 2018). Esse resultado foi bastante intrigante devido ao alto número de *hits* correspondentes. Além disso, esse microrganismo ainda não foi detectado no sêmen humano e os seus efeitos sobre a fertilidade masculina também não foram descritos.

Caracterização taxonômica das seqüências bacterianas

As bactérias apresentaram uma maior biodiversidade de espécies na amostra analisada, com 948 *hits*, sendo 544 referentes a bactérias não cultiváveis. Além disso, foram identificados 25 gêneros, sendo os mais abundantes: *Acinetobacter* (levm=-83,157), *Pseudomonas* (levm=-54,008), *Gardnerella* (levm=-137,77) e *Lactobacillus* (levm=-133,32). Da mesma forma, 120 espécies também foram identificadas. Dentre essas espécies, as que apresentaram um número de *hits* acima de 2 e um valor levm superior a -100,000 foram: *Lactobacillus crispatus*; *Haemophilus parainfluenzae*; *Gardnerella vaginalis*; *Neisseria sicca*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas mendocina*; *Fingoldia magna*; *Prevotella intermedia*; *Acinetobacter pitii*; *Acinetobacter baumannii* e *Acinetobacter junii*. Sendo *L. crispatus* e *G. vaginalis*, as espécies mais abundantes.

O fato da maioria dos *hits* terem sido classificados como bactérias não cultiváveis é um achado positivo, uma vez que as abordagens metagenômicas, assim como outras tecnologias baseadas no sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS), são uma excelente opção para a análise e identificação de organismos incultiváveis ou que exigem um longo período de cultivo em laboratório. Assim, essa abordagem possibilitou a descoberta de novas espécies de bactérias e a identificação de organismos que não são identificados por técnicas microbiológicas convencionais.

Esses resultados são semelhantes aos observados por WENG et al. (2014), que também identificaram uma maior prevalência de *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, e *Gardnerella* em 96 amostras de sêmen por uma análise metagenômica, o que mostra a comparabilidade e confiabilidade dos nossos dados de sequenciamento. Além disso, eles também relataram que a *G. vaginalis* é uma bactéria comensal do trato genital masculino inferior, mas que pode atuar como um microrganismo oportunista e que o *L. crispatus* tem um potencial papel na manutenção do ecossistema seminal e na qualidade do sêmen, sendo assim, um marcador positivo para a fertilidade masculina. Dessa forma, investigações clínicas desses organismos podem ser úteis para indicar possíveis causas de infertilidade masculina.

Conclusões

Neste estudo, foi possível demonstrar que o sequenciamento metagenômico *shotgun* é uma ferramenta eficaz para identificação de patógenos, permitindo a avaliação da biodiversidade e abundância do microbioma seminal, indicando que o sêmen não é um ambiente estéril, mas que pode atuar como um reservatório para diferentes tipos de microrganismos que, por sua vez, são capazes de exercer impactos significativos sobre a fertilidade masculina.

Dessa forma, foi observada uma expressiva diversidade bacteriana e um forte indício de novos patógenos no sêmen, que ainda não tinham sido descritos na literatura até o presente momento, como é o caso

dos protozoários *Plasmodium vivax* e *Toxoplasma gondii* e do helminto *Spirometra erinaceieuropaei*. Além disso, a abordagem *shotgun* também possibilitou a identificação de sequências microbianas integradas no genoma do hospedeiro, como os *hits* referentes aos retrovírus endógenos humanos. Também foi possível identificar sequências virais e bacterianas de microrganismos frequentemente detectados no sêmen humano, como o HPV, herpesvírus, *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus crispatus*, o que mostra a confiabilidade dos dados de sequenciamento gerados.

Assim, a aplicação do sequenciamento metagenômico *shotgun* é importante para uma maior eficiência na identificação dos principais patógenos no sêmen humano, que podem servir como potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, auxiliando, dessa forma, o tratamento de infertilidade de pacientes submetidos a procedimentos de reprodução assistida.

Referências bibliográficas

- ALTSCHUL, F. et al. Basic local alignment search tool. **JMB**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDREWS, S. et al. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>.
- BZHALAVA, D. et al. Phylogenetically diverse TT virus viremia among pregnant women. **Virology**, v. 43, n.2, p. 427–434, 2012.
- BORGHT, V et al. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. **C Biochemistry**, v. 62, p. 2–10, 2018.
- COMAR, M. et al. Association between the JC Polyomavirus Infection and Male Infertility. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.
- CHEN, J. et al. Transactivation of human endogenous retroviruses by tumor viruses and their functions in virus-associated malignancies. **Oncogenesis**, v. 8, n. 1, 2019.
- GIMENES, F. et al. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. **NR Urology**, v. 11, n. 12, p. 672–687, 2014.
- HUGENHOLTZ, P. et al. Microbiology: metagenomics. **Nature**, v. 455, n. 7212, p. 481, 2008.
- JEON, K. et al. Differential Diagnosis of Human Sparganosis Using Multiplex PCR. **KJ Parasitol**, v. 56, n. 3, p. 295–300, 2018.
- KAMP, C. et al. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. **HMG**, v. 9, n. 17, p. 2563–2572, 2000.
- LANDER, S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v.409, n. 6822, p. 860-921, 2001.
- MAYSER, P. et al. The frequency and spectrum of Malassezia yeasts in the area of the prepuce and glans penis. **BJU Int**, v. 88, p. 554, 2001.
- NAUMENKO, A. et al. Detection of human cytomegalovirus in motile spermatozoa and spermatogenic cells in testis organotypic culture. **Herpesviridae**, v. 2, n. 1, p. 7, 2011.
- NEOFYTOU, E. et al. Prevalence of human herpes virus types 1–7 in the semen of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters. **Fertil Steril**, v. 91, n. 6, p. 2487–2494, 2009.
- ONDOV, D. et al. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, 2011.
- PILATZ, A. et al. Infektionen und Infertilität [Infection and infertility]. **Urology A**, v. 557, n. 5, p. 883-889, 2016.
- SINGER, R. et al. Decreased semen quality in a male infected with malaria. **IJ Andrology**, v. 10, n. 5, p. 685–689, 1987.
- TERPSIDIS, I. et al. Toxoplasma gondii: Reproductive parameters in experimentally infected male rats. **E Parasitol**, v. 121, n. 3, p. 238–241, 2009.
- THONNEAU, P. et al. Occupational heat exposure and male fertility: a review. **H Reproduction**, v. 13, n. 8, p. 2122–2125, 1998.
- WENG, L. et al. Bacterial Communities in Semen from Men of Infertile Couples: Metagenomic Sequencing Reveals Relationships of Seminal Microbiota to Semen Quality. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.
- WHO. WHO Manual for the Standardised Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. 2000.
- YANG, Y. et al. Correlation between HPV sperm infection and male infertility. **AJ Andrology**, v. 15, n. 4, p. 529–532, 2013.