



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Câmpus de São José do Rio Preto

Maria Letícia Duarte Lima

Investigação da Infecção por Zika Vírus no Sistema Genital
Masculino de Camundongo

São José do Rio Preto

2019

Maria Letícia Duarte Lima

Investigação da Infecção por Zika Vírus no Sistema Genital
Masculino de Camundongo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal

Coorientadoras: Dra. Cintia Bittar Oliva
Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon

São José do Rio Preto

2019

L732i	Lima, Maria Letícia Duarte Investigação da infecção por Zika vírus no sistema genital masculino de camundongo / Maria Letícia Duarte Lima. -- São José do Rio Preto, 2019 69 p. : il. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Paula Rahal 1. Microbiologia. 2. Virologia. 3. Zika vírus. 4. Sistema genital masculino. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Maria Letícia Duarte Lima

Investigação da Infecção por Zika Vírus no Sistema Genital
Masculino de Camundongo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Paula Rahal

UNESP – Campus de São José do Rio Preto

Orientadora

Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior

UNESP – Campus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi

UFTM – Uberaba

São José do Rio Preto

1 de março de 2019

**Dedico este trabalho aos meus pais,
Celso R. Lopes Lima e Maria
Regina D. Lima, por não medirem
esforços para que eu alcançasse
meus sonhos e objetivos e por
sempre estarem ao meu lado, me
apoiando, incentivando e
orientando.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente Deus, por tudo em minha vida e por estar sempre à frente, cuidando de tudo, me dando forças e me iluminando no caminho;

À minha Orientadora Profa. Dra. Paula Rahal, pelas oportunidades, pelo acolhimento no laboratório em 2014, por todo crescimento que tive nesses anos sob sua orientação, pelos conselhos e todo apoio;

Às minhas Coorientadoras Dra. Cíntia Bittar Oliva e Dra. Marília de Freitas Calmon, por todo ensinamento e paciência, acompanhamento, por me ouvirem, aconselharem e darem sempre o seu melhor para o meu aprendizado e crescimento. Agradeço por serem peças importantíssimas, juntamente com minha orientadora, para o desenvolvimento deste trabalho;

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Estudos Genômicos: Ágata, Ana Emília, Bárbara, Bárbara, Bianca, Dayla, Francielly, Guilherme, Igor, Lenira, Lucas, Nayara, Pamela, Patrícia, Ricardo, Tairine e Tamara que sempre me ajudaram em tudo que foi necessário, pelos conselhos, partilhas, apoio e pelos momentos de risada e descontração;

Aos amigos não estão mais presentes no laboratório Carina, Stephane, Rafael, mas que fizeram e fazem parte de minha formação e crescimento. Agradeço pela amizade que mantemos, mesmo que a distância, pela grande ajuda, risadas e parceria nestes anos desde os tempos de graduação e/ou de laboratório, tornando a jornada mais agradável. Com certeza também fazem parte deste momento;

Às minhas amigas Fran e Tamarinha, amigades que foram grandes presentes que o mestrado me trouxe! Por mais que nosso tempo de convivência no laboratório seja maior que isso, nestes últimos dois anos nos aproximamos mais, criamos laços mais fortes. Agradeço por sempre me socorrerem quando preciso, por me auxiliarem tanto na minha vida pessoal e profissional, pelas dicas, ideias, ensinamentos, por me suportarem em tantos momentos, por me fazerem rir muito, por sempre me darem a mão;

À minha amiga Ágata, que desde o início do mestrado, mesmo sem me conhecer direito na época, me ajudou nos meus momentos de desesperos, sendo para este trabalho uma importante colaboradora e para minha vida, uma amizade muito especial. Agradeço aos momentos de trocas de ideias, de análises, de realização de experimentos e, principalmente, pelas boas risadas e alegrias compartilhadas;

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia e Microanálise, UNESP/IBILCE, em especial ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior e ao aluno de doutorado, Me. Luiz Henrique Alves Guerra, por todo auxílio e ensinamentos na parte de manutenção dos animais e dos processamentos histológicos em geral;

Ao Prof. Dr. Luis Carlos de Souza, USP – São Paulo, pela doação das matrizes dos camundongos;

À banca examinadora, Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior e Profa. Dra. Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi e aos suplentes Dr. Ricardo Mariutti e Dra. Milena Polotto, por terem aceito o convite e contribuírem com este trabalho;

A todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram no cuidado com os camundongos;

À toda minha família, especialmente meus pais Celso e Maria Regina, por serem sempre meu ponto de apoio, por sempre me incentivarem, acreditarem e por me possibilitarem a chegar aqui. Ao meu irmão Lucas Duarte Lima, aos meus avós, Constantina, Antônio, Olávia e Orlando, e demais familiares, por sempre acreditarem em mim, me darem toda força e apoio em todos os momentos da minha vida;

Ao meu esposo Marco Antonio Faria Filho, por ao meu lado em todos os momentos, por crescermos juntos, sorrirmos, darmos suporte um ao outro. Por sempre me apoiar e me incentivar a seguir em frente;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

***“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível”***

São Francisco de Assis

RESUMO

O *Zika virus* (ZIKV), arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, teve seu primeiro caso de transmissão autóctone relatado no Brasil em 2015. Sua rápida dispersão, não só pelo Brasil, mas por diversos países do mundo, tem trazido muitas preocupações, principalmente por sua infecção estar relacionada com vários casos de síndrome congênita do Zika em fetos de gestantes infectadas, assim como o aumento do número de casos da síndrome de Guillain-Barré. Além da transmissão por vetores artrópodes, casos de transmissão sexual foram relatados e verificou-se altos títulos virais no sêmen, mesmo após o fim da viremia. Um estudo detectou o vírus no sêmen por 62 dias após o fim dos sintomas, enquanto outro verificou por mais de um ano a presença do vírus nesse mesmo fluido. Para melhor esclarecer a infecção por ZIKV no sistema genital masculino, seus efeitos e em quais órgãos desse sistema o vírus se replica, modelos animais vêm sendo utilizados para tal, dentre eles o camundongo AG129. Este trabalho teve como objetivo estudar a infecção por ZIKV em células e órgãos do sistema genital masculino desses camundongos no pico da viremia. Foram avaliados: testículos, epidídimo e complexo prostático (vesícula seminal e próstata) dois dias após a infecção com o vírus. Para isso, foram utilizados 11 camundongos AG129, divididos em 2 grupos por metodologia: 5 para PCR em tempo real e 6 para imuno-histoquímica. Utilizamos o sangue e cérebro como controle positivo e um camundongo não-infectado em cada metodologia com controle negativo. Detectamos, através de qPCR, a presença do vírus em todos os órgãos analisados e obtivemos a seguinte média de títulos virais (em cópias de RNA) em cada: $6,76 \times 10^8$ no cérebro; $7,6 \times 10^8$ nos testículos; $6,13 \times 10^8$ nos epidídimos; $4,41 \times 10^7$ no complexo prostático e $9,41 \times 10^{10}$ no soro. As imuno-histoquímicas demonstraram uma infecção inicial nestes órgãos, em que o vírus pode ser encontrado por muitas vezes próximo ou dentro de vasos sanguíneos, sendo que também pode ter sido observada algumas marcações no tecido em si. Nos testículos e epidídimos a infecção nos

tecidos se mostrou mais significativa do que na próstata, mas nesta última também foi possível observar a imunorreatividade para ZIKV em seus epitélios. A verificação da proteína viral não-estrutural NS5, a RNA polimerase viral, nos tecidos dos testículos, epidídimos e até mesmo da próstata dá indícios de que o vírus é capaz de se replicar nestes órgãos. Portanto, a análise em 2 dias após a infecção destes órgãos, demonstrou altos títulos de RNA viral e uma infecção inicial nos tecidos, sendo mais robustas em testículo e epidídimo, além da imunorreatividade próxima a vasos e em leucócitos no interior deles.

Palavras-chave: ZIKV, Zika vírus, sistema genital masculino, camundongo, AG129.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV), arbovirus belonging to the Flaviviridae family, genus Flavivirus, had its first case of autochthonous transmission reported in Brazil in 2015. Its rapid dispersion, not only by Brazil, but by several countries of the world, has brought many concerns, mainly due to its infection is related to many cases of Congenital Zika Syndrome in fetuses of infected pregnant women, as well as the increase in the number of cases of Guillain-Barré syndrome. In addition to transmission by arthropod vectors, cases of sexual transmission have been reported and high viral titers have been found in semen, even after the end of viremia. One study detected the virus in the semen for 62 days after the end of symptoms, while another verified for more than a year the presence of the virus in that same fluid. In order to better clarify the ZIKV infection in the male genital system, its effects and in which organs of this system the virus replicates, animal models have been used for this, among them the mouse AG129. This work aimed to study ZIKV infection in cells and organs of the male genital tract of these mice at peak of viremia. Testis, epididymis and prostatic complex (seminal vesicle and prostate) were evaluated two days after infection with the virus. For this, 11 AG129 mice were used, divided into 2 groups by methodology: 5 for real-time PCR and 6 for immunohistochemistry. We used the blood and brain as a positive control and an uninfected mouse in each negative control methodology. We detected, through qPCR, the presence of the virus in all analyzed organs and obtained the following mean viral titers (in RNA copies) in each: 6.76×10^8 in the brain; 7.6×10^8 in the testicles; $6,13 \times 10^8$ in the epididymides; 4.41×10^7 in the prostatic complex and 9.4×10^{10} in the serum. Immunohistochemistry has demonstrated an initial infection in these organs, in which the virus can be found often near or within blood vessels, and some markings on the tissue itself may also have been observed. In the testis and epididymis tissue infection was more significant than in the prostate, but in the latter it was also possible to observe the immunoreactivity to ZIKV in its epithelia. The verification of NS5 nonstructural

viral protein, viral RNA polymerase, in the tissues of the testes, epididymis and even the prostate gives evidence that the virus is able to replicate in these organs. Therefore, the analysis at 2 days post-infection of these organs showed high titers of viral RNA and an initial infection in the tissues, being more robust in testicles and epididymis, besides the immunoreactivity close to vessels and in leukocytes inside them.

Keywords: ZIKV, Zika virus, male reproductive tract, mice, AG129.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	16
Considerações gerais	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Arbovírus	17
1.2. Ocorrência de arboviroses no Brasil	19
1.3. O Zika vírus	20
1.4. Epidemiologia	23
1.5. Sintomas e agravamentos	24
1.6. Transmissão	26
1.7. Modelos animais e a infecção no sistema genital masculino	28
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo geral	32
2.2. Objetivos específicos	32
3. REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO II	42
Artigo científico	42
Abstract.....	44
1. Introduction	45
2. Material and Methods.....	46
2.1. Ethics statement	46
2.2. Cell culture.....	46
2.3. Virus preparation.....	46
2.4. Virus titration	47
2.5. Animals	47

2.6.	RNA extraction, cDNA synthesis and real time PCR	48
2.7.	Histology and Immunohistochemistry	48
2.8.	Data analysis	49
3.	Results.....	49
3.1.	Zika virus was detected in high titers in male reproductive tract organs	49
3.2.	MRT organs display an initial infection at 2 days post-infection by ZIKV	50
3.3.	ZIKV replicates in the organs of MRT.	51
4.	Discussion	61
5.	Conclusion	64
6.	References	65
CAPÍTULO III.....		68
Conclusão		68
1.	CONCLUSÃO	69

CAPÍTULO I

Considerações gerais

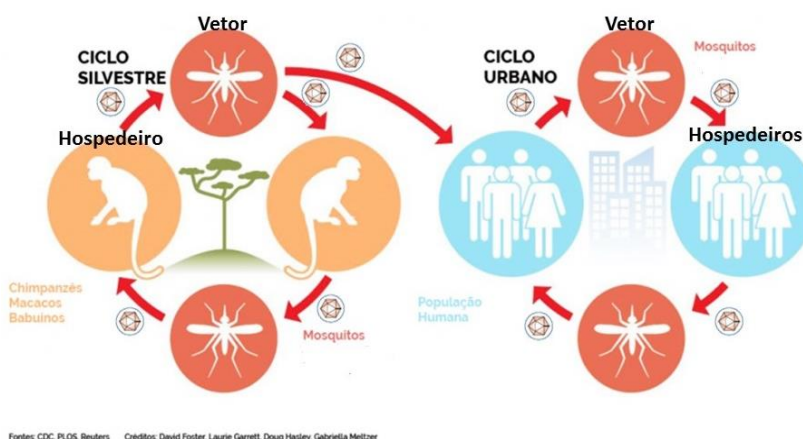
1. INTRODUÇÃO

1.1.Arbovírus

Os arbovírus são vírus transmitidos para os hospedeiros vertebrados por meio de vetores artrópodes hematófagos (WEAVER; REISEN, 2010). Estão envolvidos em um ciclo de vida complexo, adaptando-se a fazer sua multiplicação tanto em tecidos do vetor invertebrado, assim como nos dos hospedeiros vertebrados (Figura 1) (DIMMOCK;EASTON; LEPPARD, 2007).

Tais vírus possuem uma distribuição mundial, como exemplificado pelo mapa da figura 2, sendo esta dependente de parâmetros ecológicos que regem o seu ciclo de transmissão. Além disso, a distribuição dos arbovírus é limitada pelos padrões de vegetação, temperatura e precipitação da região, fatores estes que interferem na forma como os vetores artrópodes e os hospedeiros vertebrados estão distribuídos (GUBLER, 2001). Encontram-se principalmente em regiões tropicais, mas há exemplos encontrados em regiões temperadas (DIMMOCK;EASTON; LEPPARD, 2007). Os hospedeiros funcionam como reservatório e, no ciclo, fazem a manutenção do vírus (GUBLER, 2001).

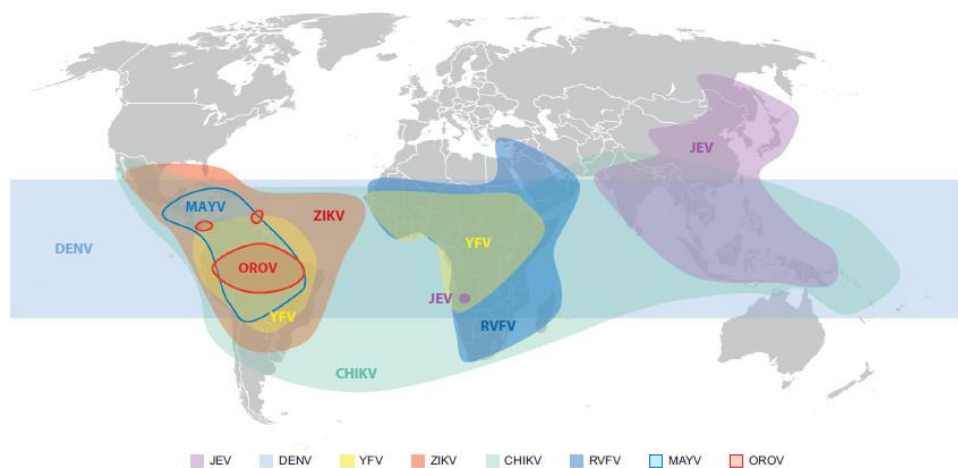
Figura 1: Exemplo de ciclo de transmissão de arbovírus em que, neste caso, o vetor é um mosquito e os hospedeiros são primatas não-humanos, no ciclo silvestre, e humanos no ciclo urbano.



Fonte: (CEARÁ) - modificado

Existem mais de 540 espécies suspeitas de serem arbovírus, sendo que, dessas, mais de 150 delas foram relatadas como responsáveis por doenças em humanos. A maior parte das espécies desses vírus é pertencente às famílias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* e *Togaviridae*, já um menor número faz parte das famílias *Reoviridae* e *Orthomyxoviridae* (CLETON et al., 2012).

Figura 2: Mapa da distribuição mundial das principais arboviroses da atualidade (JEV = vírus da encefalite japonesa; DENV = vírus da dengue; YFV = vírus da febre amarela; ZIKV = Zika vírus; CHIKV = vírus Chikungunya; RVFV = vírus da febre de Vale Rift; MAYV = vírus Mayaro; OROV = vírus Oropouche).



Fonte: (WEAVER et al., 2018)

Fatores que vão desde a epidemiologia à genética viral fazem com que os arbovírus sejam capazes de causar doenças em humanos. A exposição destes últimos a esses vírus deve-se à invasão ao ambiente silvestre, assim como quando eles são trazidos a áreas domésticas por vetores dos mesmos (WEAVER; REISEN, 2010).

A disseminação de uma determinada espécie de arbovírus em determinadas regiões pode, rapidamente, se tornar uma epidemia por uma série de fatores, como as pequenas mudanças na genética dos vírus ou até mesmo o surgimento de novas cepas. Isso pode aumentar os níveis de virulência e viremia nos hospedeiros

vertebrados, elevando a capacidade de disseminação dos mesmos. Modificações no ambiente podem levar a alterações na composição das espécies de vetores e/ou hospedeiras, podendo criar novos nichos ou expandir os antigos, o que é capaz de aumentar a dispersão de arbovírus. Viagens internacionais e o comércio facilitam a inserção desses vírus em novos ambientes. Ademais, uma área receptiva à essa invasão relaciona-se com condições favoráveis daquele ambiente à replicação viral. Na atualidade, verificamos a expansão da urbanização que leva a altas concentrações de humanos como potenciais hospedeiros, já que estão suscetíveis, além da criação de ilhas de calor formadas pelo perímetro urbano, que criam um ambiente favorável e facilitam a invasão desses arbovírus (WEAVER; REISEN, 2010).

1.2.Ocorrência de arboviroses no Brasil

O Brasil, um grande país tropical com 8.515.767,049 km² de extensão e com população com quase de 209 milhões de pessoas, segundo o IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2018), possui, em sua maior parte, um clima tropical e uma ampla biodiversidade de plantas e animais, tendo, portanto, alto potencial para a ocorrência de arboviroses. Além disso, a maior parte da população brasileira vive em ambientes urbanos e que, muitas vezes, funciona como ambiente propício ao desenvolvimento e ocorrência de vetores dessas doenças causadas por arbovírus, como mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* (KNIPE; HOWLEY, 2013; VASCONCELOS; CALISHER, 2016). Visto isso, foram isoladas mais de 200 espécies de arbovírus no Brasil, sendo que mais de 30 deles causam doenças em humanos (VASCONCELOS; CALISHER, 2016).

Até 2015, pelo menos 9 espécies de arbovírus estavam relacionadas com a causa de doenças humanas emergentes no Brasil, estando distribuídos entre os gêneros *Alphavirus* (família *Togaviridae*), *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) e *Orthobunyavirus* (família *Bunyaviridae*). Dentre os arbovírus do gênero *Alphavirus* estão os vírus: Mayaro (MAYV), Chikungunya (CHIKV), Encefalite equina oriental (EEEV) e Encefalite equina venezuelana (VEEV). Já entre os do gênero *Flavivirus* estão: vírus da febre amarela (YFV), Encefalite de Saint Louis (SLEV),

West Nile (WNV) e vírus complexo da encefalite japonesa (ROCV). O arbovírus do gênero *Orthobunyavirus* descrito por causar arbovirose no Brasil é o Oropouche (OROV) (FIGUEIREDO, 2007).

No início de 2015, o serviço público de Natal-RN, relatou casos de pacientes com sintomas semelhantes aos da dengue, mas os dados laboratoriais indicaram uma infecção negativa para DENV e CHIKV. Os sintomas clínicos apresentados por esses pacientes eram compatíveis com os da infecção pelo arbovírus *Zika virus* (ZIKV), portanto, foram realizados testes laboratoriais específicos para ZIKV. Das 21 amostras que passaram pelos testes, 8 apresentaram positividade para esse vírus. Com isso, foi reportado o primeiro caso de transmissão autóctone de ZIKV no Brasil (ZANLUCA et al., 2015), somando a décima arbovirose relacionada com a causa de doenças humanas emergentes no país (FIGUEIREDO, 2015).

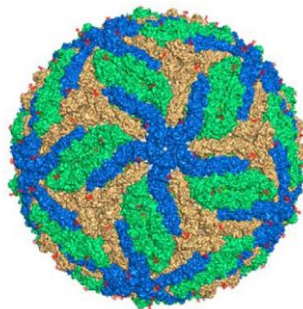
1.3. O Zika vírus

O *Zika virus* (Figura 2) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e foi isolado pela primeira vez em 1947 em macacos *Rhesus* sentinela na floresta Zika em Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; VASCONCELOS; CALISHER, 2016). A transmissão desse vírus é feita por algumas espécies de mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, além de primatas não humanos servirem de hospedeiro intermediário ou ainda como reservatório (VASCONCELOS; CALISHER, 2016).

O ZIKV possui um genoma de RNA de fita simples positiva com aproximadamente 10,8 kb, que contém apenas uma *open reading frame* (ORF), apresentando nas duas extremidades regiões não-traduzidas (do inglês, *untranslated region*, sigla UTR) (CHAMBERS et al., 1990; KUNO; CHANG, 2007). Essa ORF codifica um precursor poliproteico que é clivado em três proteínas estruturais, sendo elas a C (capsídeo), prM (pré-membrana) e E (envelope), que são responsáveis por formar a partícula viral, e sete não-estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, que possuem papéis primordiais na replicação do genoma do vírus, no processamento de poliproteínas, além de serem importantes no escape das respostas imunes do hospedeiro, sendo a NS5 a RNA polimerase

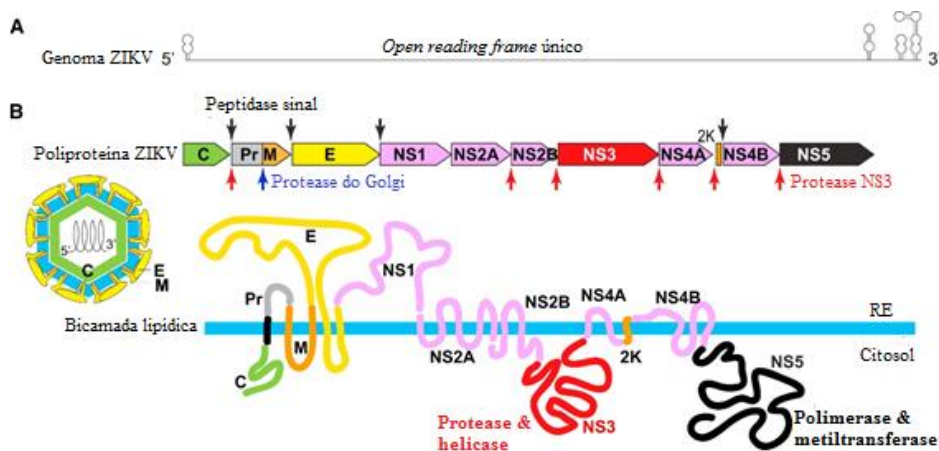
dependente de RNA (Figura 3) (CHAMBERS et al., 1990; KNIPE; HOWLEY, 2013; YE et al., 2016).

Figura 2: Representação da partícula madura de *Zika virus*.



Fonte: (SAIZ et al., 2017) – adaptado.

Figura 3: Representação do genoma de ZIKV e das principais proteínas estruturais e não estruturais.

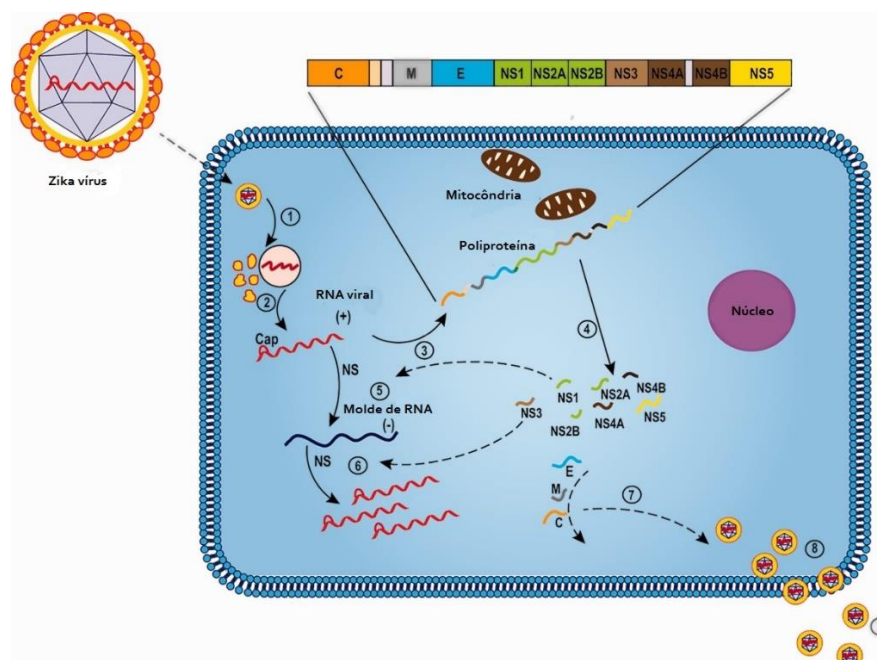


Fonte: (MING;TANG; SONG, 2016) – adaptado.

Para se replicar, os vírions se ligam a membrana da célula hospedeira por meio de interações entre glicoproteínas de superfície viral e receptores de membrana na célula hospedeira. A entrada na célula ocorre por endocitose mediada por receptores e os vírions são internalizados por invaginações recobertas por clatrina (GOLLINS; PORTERFIELD, 1985; KNIPE; HOWLEY, 2013; WHITE et al., 2016). Para que ocorra o desnudamento da partícula viral, ocorre uma acidificação da vesícula do endossomo, na qual ocasiona uma mudança

conformacional no vírion, fusão das membranas celular e viral e liberação do genoma viral para o citoplasma celular. O RNA fita simples de polaridade positiva é traduzido em uma poliproteína, que é clivada por proteases celulares e virais. Tal processamento leva a formação de 10 proteínas, sendo 3 delas estruturais (C, prM e E), localizadas na porção N-terminal da poliproteína, e 7 não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), localizadas na porção C-terminal da poliproteína (Figura 3). A replicação do genoma viral ocorre no citoplasma, em associação com as membranas intracelulares, e se inicia síntese da cadeia negativa de RNA, que servirá de modelo para formação de novas fitas de RNA sentido positivo. A montagem das novas partículas virais é feita na superfície do retículo endoplasmático por brotamento e elas, então, irão passar ao longo da via secretora da célula hospedeira por meio da rede trans-Golgi, onde irá ocorrer a maturação do vírion, que será liberado da célula por exocitose (Figura 4) (KNIPE; HOWLEY, 2013; WHITE et al., 2016).

Figura 4: Ciclo replicativo de ZIKV.



Fonte: (WHITE et al., 2016) - adaptado.

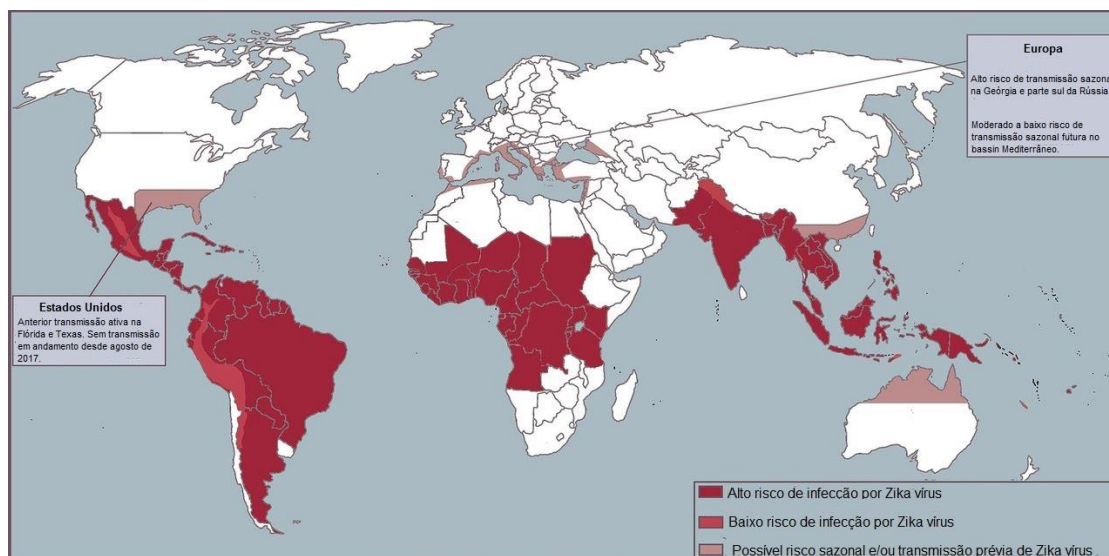
1.4. Epidemiologia

Poucos casos de infecção humana por ZIKV foram relatados até 2007, quando uma epidemia desse vírus ocorreu em Yap Island, Estados Federados da Micronésia. Aproximadamente três quartos da população local apresentou infecção por *Zika virus*, que casou uma doença relativamente mais amena com duração de vários dias, sem mortes ou hospitalizações das pessoas infectadas (DUFFY et al., 2009).

Como já descrito anteriormente, o primeiro caso de transmissão autóctone de ZIKV no Brasil ocorreu em 2015 (ZANLUCA et al., 2015). Por meio de estudos filogenéticos, verificou-se que a variante do vírus Zika que circula no Brasil pertence à linhagem asiática e assemelha-se em 99% com a sequência de uma amostra isolada de um paciente da Polinésia Francesa (CAMPOS;BANDEIRA; SARDI, 2015). Uma hipótese levantada como uma possível causa da chegada desse vírus ao Brasil foi a Copa do Mundo de Futebol realizada em 2014 no país (ZANLUCA et al., 2015), porém, nenhum país endêmico para ZIKV participou do evento. A hipótese mais provável é que esse vírus tenha chegado ao país quando ocorreu, em agosto de 2014, uma competição de canoagem no Rio de Janeiro, RJ, em que quatro países do Pacífico (Polinésia Francesa, Ilha da Páscoa, Ilhas Cook e Nova Caledônia) que havia circulação do ZIKV participaram (MUSSO, 2015).

Porém, um estudo publicado em 2017 analisou amostras coletadas no Rio de Janeiro em abril de 2013, que foram negativas para dengue e encontraram que das 210 amostras, 3 foram positivas para *Zika virus* (PASSOS et al., 2017). Tais achados suportam a hipótese de que este vírus possa ter chegado ao Brasil entre outubro de 2012 e maio de 2013, como estudos filogenéticos com mosquitos *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* também no Rio de Janeiro, que mostraram que o ZIKV provavelmente chegou ao país em 2013 (AYLLON et al., 2017).

Figura 5: Mapa mundial que demonstra o risco das ocorrências da febre Zika.



Fonte: (LEONHARD et al., 2018) – adaptado.

Segundo a *Pan American Health Organization/World Health Organization* (2018) o Brasil teve mais de 137 mil casos confirmados de infecção por ZIKV até janeiro de 2018.

Atualmente, a febre Zika foi reportada em 85 países/territórios, a grande maioria dos casos foram considerados de transmissão autóctone por vetores, porém em 8 países europeus e em 48 estados dos Estados Unidos os casos foram relacionados a viagens (Figura 5) (LETA et al., 2018).

1.5. Sintomas e agravamentos

A infecção por *Zika virus* geralmente é assintomática, sendo que somente uma pequena parcela dos infectados apresentam sintomas não específicos, como erupções cutânea e febre (YE et al., 2016). Além disso, a infecção pode causar também cefaleia, conjuntivite não purulenta, mialgia, artralgia e astenia. Esse conjunto de sintomas é semelhante ao de outras arboviroses, como as de doenças causadas pelos vírus da Dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV), podendo dificultar o diagnóstico (ARAUJO; FERREIRA; NASCIMENTO, 2016).

Durante o surto de *Zika virus* na Polinésia Francesa em 2013/2014, observou-se a associação da infecção pelo vírus com alterações neurológicas, como o aumento da síndrome Guillain-Barré (ARAUJO; FERREIRA; NASCIMENTO, 2016). O mesmo foi observado no Brasil, onde após o surto de ZIKV, houve um aumento claro da ocorrência dessa síndrome (KLEBER DE OLIVEIRA et al., 2016).

Além disso, no Brasil, de 2014 a 2015 ocorreu um grande aumento nos casos de microcefalia em cerca de 20 vezes, período que coincide com o surgimento do vírus Zika no país. Isto levou profissionais da saúde a acreditarem em uma possível correlação da infecção de mulheres grávidas com o ZIKV ao desenvolvimento de microcefalia em seus bebês (FAUCI; MORENS, 2016).

Alguns estudos tiveram resultados que sustentam essa hipótese, como o de Calvet, et al. (2016) que fizeram testes em duas pacientes gestantes, cujos bebês foram diagnosticados com microcefalia e em ambas foi detectado o RNA do ZIKV, estirpe brasileira (ZIKV^{BR}) (CALVET et al., 2016). Além disso, o IgM anti-Zika foi encontrado no líquido amniótico, o que sugere que o vírus pode atravessar a barreira placentária, havendo a possibilidade de infectar o feto. Um outro estudo verificou a presença do ZIKV^{BR} em cérebro de um feto abortado que havia sido diagnosticado também com microcefalia, sugerindo forte ligação dessa lesão cerebral grave com a infecção por esse vírus (MLAKAR et al., 2016).

Cugola et al. (2016) infectaram fêmeas grávidas de camundongos com ZIKV^{BR} e verificaram que os tecidos fetais desses animais eram suscetíveis a infecção por esse vírus, observando também um grave crescimento retardado intrauterino, assim como sinais de microcefalia. Além disso, foi descrito por eles que a cepa brasileira de ZIKV levou a apoptose e autofagia de células neurais desses camundongos. Tal estudo traz mais evidências da relação da infecção por ZIKV e o aumento dos casos de microcefalia em fetos humanos (CUGOLA et al., 2016).

Além da microcefalia, foram observados outros defeitos congênitos e esse conjunto de má-formações foi chamado de Síndrome Congênita do Zika (do inglês, *Congenital Zika Syndrome* – CZS). Tal síndrome é descrita por cinco características: 1) grave microcefalia, na qual ocorre parcial colapso do crânio; 2)

redução do tecido cerebral com padrão específico de dano, o que inclui calcificações subcorticais; 3) cicatrizes maculares e manchas na retina pigmentar focal; 4) contraturas congênitas, tais como artrogripose (limitação dos movimentos de articulação) e pés tortos; 5) restrição do movimento do corpo logo após o nascimento, devido a hipertonia. Além disso, outras anormalidades foram relacionadas à CZS, como tremores, convulsões, glaucoma, catarata, entre outras. Tal síndrome ocorre somente em fetos e bebês que foram infectados pelo Zika antes do nascimento (PREVENTION; MOORE et al., 2017).

1.6. Transmissão

Além da transmissão por alguns vetores artrópodes, há evidências de que o ZIKV pode ser transmitido via perinatal (BESNARD et al., 2014) e também via transfusão de sangue e hemoderivados, pois foi detectado um alto número de doadores de sangue assintomáticos à infecção por ZIKV, cerca de 3% deles, na Polinésia Francesa (MUSSO et al., 2014).

Evidências de transmissão sexual também foram obtidas, como foi relatado por Foy, et al. (2011) em que um homem americano viajou para o Senegal e depois que retornou ao seu país, apresentou sintomas de infecção por ZIKV. Alguns dias depois, sua esposa, que nunca havia viajado para África ou Ásia e também não havia saído dos EUA nos últimos anos, apresentou sintomas de infecção por esse vírus. Os resultados evidenciaram a infecção do homem por ZIKV e a transmissão sexual do marido para a esposa, pois eles tiveram relações sexuais quando ele voltou de viagem, podendo-se suspeitar que o sêmen infectado pode ter contaminado a mulher (FOY et al., 2011).

Outro caso reportado de transmissão sexual de *Zika virus*, ocorreu no Texas, EUA. Um viajante apresentou sintomas parecidos com os da infecção por ZIKV quando retornou da Venezuela. Seu parceiro sexual, que não havia viajado, também apresentou sintomas, sendo que o teste de ambos foi positivo para esse vírus (DECKARD et al., 2016). Além destes, outros possíveis casos de transmissão sexual do ZIKV foram relatados, sendo alguns relatos de transmissão de homem - mulher (FOY et al., 2011; MUSSO et al., 2015; ARSUAGA et al., 2016;

D'ORTENZIO et al., 2016; TURMEL et al., 2016), do homem – homem (DECKARD et al., 2016) e mulher – homem (DAVIDSON et al., 2016).

Yarrington et al. (2019) relataram o caso de um bebê que nasceu com microcefalia e foi diagnosticado com síndrome congênita do Zika como resultado de uma infecção por via sexual durante sua gestação. Os pais são americanos e a gravidez ocorreu por fertilização *in vitro*. Porém, o pai viajou a trabalho várias vezes para o Haiti, antes e durante a gravidez, mas a mãe não viajou e eles não foram sintomáticos para a infecção por ZIKV, mas o RT-PCR foi positivo nas amostras de placenta, levando ao diagnóstico de Síndrome Congênita do Zika (YARRINGTON et al., 2019).

Estudos mostram altos títulos do vírus Zika no sêmen (ATKINSON et al., 2016), assim como na urina (ZHANG et al., 2016). Atkinson et al. (2016) constatou, em seu estudo de caso, que nas amostras de sêmen de um homem positivo para a infecção por ZIKV, o vírus foi identificado até 62 dias após os sintomas terem desaparecido. Ademais, resultados de outras pesquisas mostraram que o RNA do ZIKV persistiu no sêmen por praticamente 6 meses após o início dos sintomas, estando a carga viral reduzida após 3 meses. A transmissão sexual em tal situação não foi observada, não podendo porém, ser descartada sua possibilidade de ocorrência (BARZON et al., 2016; NICASTRI et al., 2016). Recentemente, Barzon e colaboradores (2018) atualizaram o caso deste paciente e o RNA de *Zika virus* foi encontrado em até 370 dias (mais de um ano) em queda persistente e baixos títulos, sendo que após este período, não foi mais detectado (BARZON et al., 2018).

Além disso, o RNA de ZIKV foi encontrado no sêmen de três homens vasectomizados (ARSUAGA et al., 2016; ATKINSON et al., 2017; FROESCHL et al., 2017). O primeiro caso foi relatado por Arsuaga e colaboradores (2016), na qual um casal havia viajado para Ilhas Maldivas, onde estiveram expostos a picadas de mosquitos, e retornaram a Madrid, Espanha, em 18 de fevereiro de 2016. No dia 21 de fevereiro, o homem começou a apresentar sintomas como febre, erupções cutâneas, dor de cabeça, fraqueza e mialgias. O casal relatou ter tido relações sexuais desprotegidas no dia 28 de fevereiro e no dia 6 de março a mulher começou a apresentar sintomas como febre, lesões cutâneas, fraqueza, olhos vermelhos. Os

exames de ambos foram positivos para ZIKV, sendo positivo por RT-PCR na urina da esposa no dia 24 da doença (do inglês, *day of illness*, sigla DOI) e no sêmen do marido em DOI 47, 69 e 96. Por mais que a transmissão à mulher possa ter ocorrido por picada de mosquito, a hipótese de ter ocorrido por via sexual é sustentada pelo fato de que o início dos sintomas da mulher foi após um longo período do retorno da viagem (18 dias), o que seria um longo período de incubação para tal vírus (ARSUAGA et al., 2016). O segundo caso, relatado por Atkinson et al. (2017) que avaliaram possíveis infecção importadas causadas pelo Zika vírus em sêmen e, dentre elas, o de um homem vasectomizado foi positivo. Froeschl et al. (2017) relataram o terceiro caso, um alemão vasectomizado que retornou da Martinica com erupções cutâneas, estado subfebril, mal-estar, dor retro-orbital. Resultados de PCR foram positivos para ZIKV no sêmen até o dia 77 após o início dos sintomas e no sangue até 101 dias (FROESCHL et al., 2017).

Modelos estatísticos sugerem que a contribuição da transmissão sexual para os casos de infecção por Zika vírus é em torno de 3,044% - 4,8% (GAO et al., 2016; MAXIAN et al., 2017).

Para esclarecer a possível transmissão sexual do ZIKV, assim como a prevalência e período de tempo que o vírus permanece no sêmen e quais as células do sistema genital são capazes de serem infectadas por esse vírus, quais células servem de reservatórios virais, mais estudos são necessários (BARZON et al., 2016; DA SILVA, 2018) e vem sendo desenvolvidos.

1.7. Modelos animais e a infecção no sistema genital masculino

Em 2016, Rossi e colaboradores apresentaram dois modelos animais da espécie *Mus musculus* suscetíveis a infecção por *Zika virus*, sendo importantes para estudar a patogênese desse vírus, assim como a pesquisa de vacinas e antivirais. Estes modelos são os camundongos A129 e AG129, ambos imunocomprometidos, sendo que o primeiro não possui o receptor para *Interferon* de tipo I (IFN α/β) e o segundo, para os tipos I e II (IFN $\alpha/\beta/\gamma$). Eles amostraram vários órgãos em ambos modelos (coração, fígado, rim, pulmão, baço, músculo, cérebro e, nos machos, testículos) quanto à carga viral, verificando que todos os órgãos continham o vírus,

mas que os principais locais de replicação do vírus foram testículo, baço e cérebro. A principal diferença entre os dois modelos, foi que na linhagem AG129 observou-se uma gravidade maior dos sintomas neurológicos (ROSSI et al., 2016).

Estudos desenvolvidos com a linhagem asiática ZIKA-SMGC-1 em camundongos machos mostraram que o vírus pode levar a inflamação do testículo e epidídimo, mas o mesmo não ocorre na vesícula seminal e na próstata. Verificaram diversas anormalidades testiculares, inclusive diminuição dos níveis de testosterona, assim como danos nas células do epidídimo (MA et al., 2016). O mesmo foi visto por Clancy et al. (2018), que analisaram a infecção por um isolado porto-riquenho de ZIKV (PRVABC59) em camundongos *knockout* IFNAR tipos I e II (AG129) e IFNAR^{-/-} tipo I entre os dias 5 a 11. Eles detectaram por imunohistoquímica o vírus nos testículos e epidídimos de ambos modelos de camundongo, onde observaram epididimite e orquite (inflamação nos testículos) e na próstata e vesícula seminal dos AG129, na qual não observaram inflamação significativa (CLANCY et al., 2018).

Outros pesquisadores mostraram que em ratos machos infectados com a cepa mexicana ZIKV^{MEX} houve uma diminuição significativa do tamanho dos seus testículos em comparação com ratos não infectados, atrofia, na qual, pode ter ocorrido devido à diminuição dos níveis de testosterona nas células infectados com o vírus. Tais achados podem sugerir que o ZIKV pode reduzir a fertilidade masculina (URAKI et al., 2017).

Em relação aos casos de homens vasectomizados em que se observou a presença de ZIKV em sêmen, como relatado anteriormente (ARSUAGA et al., 2016; ATKINSON et al., 2017; FROESCHL et al., 2017), podem sustentar a hipótese de que a replicação do ZIKV não esteja ocorrendo somente nos testículos e epidídimos, já que na vasectomia o ducto deferente é cortado e a replicação viral nestes sítios não seria detectado no sêmen (SPENCER et al., 2018) (Figura 6).

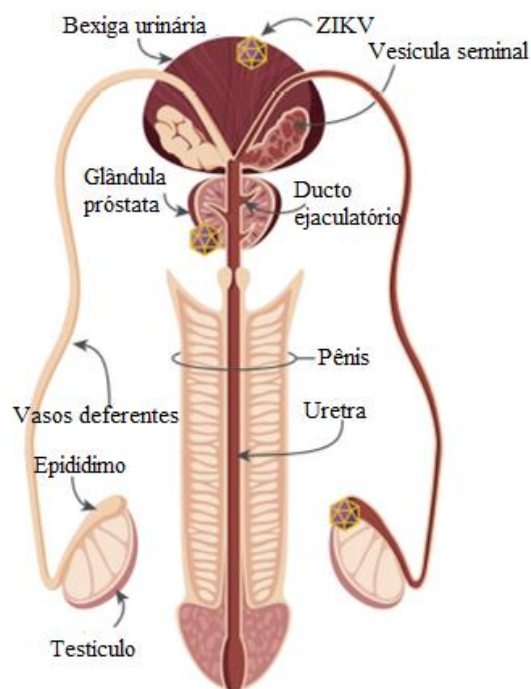
Um estudo utilizando camundongos AG129 machos, sendo alguns deles vasectomizados e outros não, infectados com ZIKV, verificou-se que os primeiros

possuíam níveis significativamente menores de vírus em relação aos demais. Porém, ao avaliar a transmissão sexual, esta ocorreu em ambos os grupos (DUGGAL et al., 2017).

Várias questões sobre a infecção por ZIKV no sistema genital masculino precisam ser esclarecidas como a origem do *Zika virus* no sêmen, os mecanismos moleculares e celulares da persistência deste vírus em tal sistema, assim como as principais células infectadas ali, dentre outros (STASSEN et al., 2018).

Tais informações são de extrema importância para o sistema de saúde pública mundial, pois tal infecção pode levar a complicações neurológicas tanto em fetos, como a síndrome congênita do Zika, podendo levar a morte do mesmo, quanto em adultos, como no caso da Síndrome de Guillian-Barré. Ademais, a transmissão sexual pode expandir o alcance desse vírus a nível mundial, já que não se limita, portanto, apenas a países que oferecerem condições para o mosquito vetor se desenvolver. Além disso, tais esclarecimentos podem contribuir no desenvolvimento de antivirais e vacinas eficientes contra o *Zika virus*.

Figura 6: Representação esquemática do sistema genital masculino com possíveis sítios de infecção por ZIKV.



Fonte: (STASSEN et al., 2018) – adaptado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo o estudo da infecção de células e órgãos do sistema genital masculino de camundongos AG129 por ZIKV^{BR} ao pico da viremia.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar a presença do ZIKV, em modelo animal, em órgãos e células do sistema genital masculino utilizando a técnica de imuno-histoquímica;
- Verificar possíveis sítios de replicação desse vírus através da análise de testículo, epidídimo e próstata dos camundongos infectados por meio técnica de imuno-histoquímica;
- Obter a titulação viral dos órgãos citados e também de cérebro e sangue de camundongos infectados com ZIKV^{BR} através da técnica de qPCR.

3. REFERÊNCIAS

ARAUJO, L. M.; FERREIRA, M. L.; NASCIMENTO, O. J. Guillain-Barre syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 74, n. 3, p. 253-255, Mar 2016. ISSN 1678-4227 (Electronic)

0004-282X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27050856>>.

ARSUAGA, M. et al. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 10, p. 1107, Oct 2016. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27676342>>.

ATKINSON, B. et al. Detection of Zika Virus in Semen. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 5, p. 940, May 2016. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27088817>>.

ATKINSON, B. et al. Presence and Persistence of Zika Virus RNA in Semen, United Kingdom, 2016. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 4, p. 611-615, Apr 2017. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27997333>>.

AYLLON, T. et al. Early Evidence for Zika Virus Circulation among Aedes aegypti Mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 8, p. 1411-1412, Aug 2017. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28628464>>.

BARZON, L. et al. Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 32, Aug 11 2016. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27542178>>.

BARZON, L. et al. Virus and Antibody Dynamics in Travelers With Acute Zika Virus Infection. **Clin Infect Dis**, v. 66, n. 8, p. 1173-1180, Apr 3 2018. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29300893> >.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**, v. 19, n. 13, Apr 3 2014. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721538> >.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 653-660, Jun 2016. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108> >.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 10, p. 1885-1886, Oct 2015. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401719> >.

CEARÁ, U. F. D. Zika - UFC e você contra o mosquito. Disponível em: <
<http://www.aedes.ufc.br/index.php/doencas/zika/> >.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol**, v. 44, p. 649-688, 1990. ISSN 0066-4227 (Print)

0066-4227 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2174669> >.

CLANCY, C. S. et al. Comparative Histopathologic Lesions of the Male Reproductive Tract during Acute Infection of Zika Virus in AG129 and Ifnar(-/-) Mice. **Am J Pathol**, v. 188, n. 4, p. 904-915, Apr 2018. ISSN 1525-2191 (Electronic)

0002-9440 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29378173> >.

CLETON, N. et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **J Clin Virol**, v. 55, n. 3, p. 191-203, Nov 2012. ISSN 1873-5967 (Electronic)

1386-6532 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22840968> >.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267-271, Jun 9 2016. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27279226> >.

D'ORTENZIO, E. et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **N Engl J Med**, v. 374, n. 22, p. 2195-2198, Jun 2 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27074370> >.

DA SILVA, L. R. C. Zika Virus Trafficking and Interactions in the Human Male Reproductive Tract. **Pathogens**, v. 7, n. 2, May 11 2018. ISSN 2076-0817 (Print)

2076-0817 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29751638> >.

DAVIDSON, A. et al. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 65, n. 28, p. 716-717, Jul 22 2016. ISSN 1545-861X (Electronic)

0149-2195 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27442327> >.

DECKARD, D. T. et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus--Texas, January 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 65, n. 14, p. 372-374, Apr 15 2016. ISSN 1545-861X (Electronic)

0149-2195 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27078057> >.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 46, n. 5, p. 509-520, Sep 1952. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12995440> >.

DIMMOCK, N. J.; EASTON, A. J.; LEPPARD, K. N. **Introduction to Modern Virology**. 6th. 2007. 516.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, Jun 11 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516034> >.

DUGGAL, N. K. et al. Frequent Zika Virus Sexual Transmission and Prolonged Viral RNA Shedding in an Immunodeficient Mouse Model. **Cell Rep**, v. 18, n. 7, p. 1751-1760, Feb 14 2017. ISSN 2211-1247 (Electronic). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28199846> >.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. **N Engl J Med**, v. 374, n. 7, p. 601-604, Feb 18 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26761185> >.

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 224-229, Mar-Apr 2007. ISSN 0037-8682 (Print)

0037-8682 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568894> >.

_____. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 3, p. 233-234, May-Jun 2015. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26107998> >.

FOY, B. D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 5, p. 880-882, May 2011. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529401> >.

FROESCHL, G. et al. Long-term kinetics of Zika virus RNA and antibodies in body fluids of a vasectomized traveller returning from Martinique: a case report. **BMC Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 55, Jan 10 2017. ISSN 1471-2334 (Electronic)

1471-2334 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28068904> >.

GAO, D. et al. Prevention and Control of Zika as a Mosquito-Borne and Sexually Transmitted Disease: A Mathematical Modeling Analysis. **Sci Rep**, v. 6, p. 28070, Jun 17 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27312324> >.

GOLLINS, S. W.; PORTERFIELD, J. S. Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry. **J Gen Virol**, v. 66 (Pt 9), p. 1969-1982, Sep 1985. ISSN 0022-1317 (Print)

0022-1317 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4031825> >.

GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Ann N Y Acad Sci**, v. 951, p. 13-24, Dec 2001. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11797771> >.

IBGE, I. B. D. G. E. E. Projeção da População do Brasil e das Unidades da Federação. 2018. Disponível em: <
<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/> >.

KLEBER DE OLIVEIRA, W. et al. Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy - Brazil, 2015. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 65, n. 9, p. 242-247, Mar 11 2016. ISSN 1545-861X (Electronic)

0149-2195 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26963593> >.

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 2013. 2582.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Arch Virol**, v. 152, n. 4, p. 687-696, 2007. ISSN 0304-8608 (Print)

0304-8608 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195954> >.

LEONHARD, S. E. et al. Zika virus infection in the returning traveller: what every neurologist should know. **Pract Neurol**, v. 18, n. 4, p. 271-277, Aug 2018. ISSN 1474-7766 (Electronic)

1474-7758 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29618586> >.

LETA, S. et al. Global risk mapping for major diseases transmitted by Aedes aegypti and Aedes albopictus. **Int J Infect Dis**, v. 67, p. 25-35, Feb 2018. ISSN 1878-3511 (Electronic)

1201-9712 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29196275> >.

MA, W. et al. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1511-1524 e1510, Dec 1 2016. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27884405> >.

MAXIAN, O. et al. Zika virus dynamics: When does sexual transmission matter? **Epidemics**, v. 21, p. 48-55, Dec 2017. ISSN 1878-0067 (Electronic)

1878-0067 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28688996> >.

MING, G. L.; TANG, H.; SONG, H. Advances in Zika Virus Research: Stem Cell Models, Challenges, and Opportunities. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 6, p. 690-702, Dec 1 2016. ISSN 1875-9777 (Electronic)

1875-9777 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27912090> >.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med**, v. 374, n. 10, p. 951-958, Mar 10 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862926> >.

MOORE, C. A. et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. **JAMA Pediatr**, v. 171, n. 3, p. 288-295, Mar 1 2017. ISSN 2168-6211 (Electronic)

2168-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27812690> >.

MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 10, p. 1887, Oct 2015. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26403318> >.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveill**, v. 19, n. 14, Apr 10 2014. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739982> >.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 2, p. 359-361, Feb 2015. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25625872> >.

NICASTRI, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 32, Aug 11 2016. ISSN 1560-7917 (Electronic)

1025-496X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27541989> >.

PASSOS, S. R. L. et al. Detection of Zika Virus in April 2013 Patient Samples, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 12, p. 2120-2121, Dec 2017. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28953451> >.

PREVENTION, C. F. D. C. A. Congenital Zika Syndrome & Other Birth Defects. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-syndrome-birth-defects.html> >. Acesso em: 10/10/2018.

ROSSI, S. L. et al. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. **Am J Trop Med Hyg**, v. 94, n. 6, p. 1362-1369, Jun 1 2016. ISSN 1476-1645 (Electronic)

0002-9637 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27022155> >.

SAIZ, J. C. et al. Zika Virus: What Have We Learnt Since the Start of the Recent Epidemic? **Front Microbiol**, v. 8, p. 1554, 2017. ISSN 1664-302X (Print)

1664-302X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28878742> >.

SPENCER, J. L. et al. Replication of Zika Virus in Human Prostate Cells: A Potential Source of Sexually Transmitted Virus. **J Infect Dis**, v. 217, n. 4, p. 538-547, Jan 30 2018. ISSN 1537-6613 (Electronic)

0022-1899 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28968863> >.

STASSEN, L. et al. Zika Virus in the Male Reproductive Tract. **Viruses**, v. 10, n. 4, Apr 16 2018. ISSN 1999-4915 (Electronic)

1999-4915 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29659541> >.

TURMEL, J. M. et al. Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. **Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2501, Jun 18 2016. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27287833> >.

URAKI, R. et al. Zika virus causes testicular atrophy. **Sci Adv**, v. 3, n. 2, p. e1602899, Feb 2017. ISSN 2375-2548 (Electronic)

2375-2548 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28261663> >.

VASCONCELOS, P. F.; CALISHER, C. H. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000-2016. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 16, n. 5, p. 295-301, May 2016. ISSN 1557-7759 (Electronic)

1530-3667 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26991057> >.

WEAVER, S. C. et al. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annu Rev Med**, v. 69, p. 395-408, Jan 29 2018. ISSN 1545-326X (Electronic)

0066-4219 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846489> >.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res**, v. 85, n. 2, p. 328-345, Feb 2010. ISSN 1872-9096 (Electronic)

0166-3542 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857523> >.

WHITE, M. K. et al. Zika virus: An emergent neuropathological agent. **Ann Neurol**, v. 80, n. 4, p. 479-489, Oct 2016. ISSN 1531-8249 (Electronic)

0364-5134 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27464346> >.

YARRINGTON, C. D. et al. Congenital Zika syndrome arising from sexual transmission of Zika virus, a case report. **Fertil Res Pract**, v. 5, p. 1, 2019. ISSN 2054-7099 (Print)

2054-7099 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30619616> >.

YE, Q. et al. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. **Infect Genet Evol**, v. 43, p. 43-49, Sep 2016. ISSN 1567-7257 (Electronic)

1567-1348 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156653> >.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, Jun 2015. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061233> >.

ZHANG, F. C. et al. Excretion of infectious Zika virus in urine. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 641-642, Jun 2016. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184420> >.

CAPÍTULO II
Artigo científico

Title: Early infection of Zika virus in male reproductive tract of AG129 mice

Maria Letícia Duarte Lima^a

Ágata Silva Cabral^a

Marília de Freitas Calmon^a

Cíntia Bittar^a

Luiz Roberto Falleiros-Junior^a

Luiz Henrique Alves Guerra^a

Bruno Moreira Carneiro^b

Luis Carlos de Souza Ferreira^c

Maurício Nogueira Lacerda^d

Sebastião Roberto Taboga^a

Paula Rahal^a

Author information:

- a. São Paulo State University—UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil
- b. Institute of Exact and Natural Science, Mato Grosso Federal University, Rondonópolis, Mato Grosso, Brazil
- c. Institute of Biomedical Science, São Paulo University - USP, São Paulo, Brazil
- d. Faculty of Medicine of São José do Rio Preto - FAMERP, São José do Rio Preto 15090-000, São Paulo, Brazil

Correspondent Author Information:

Paula Rahal

Department of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP

Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 - São José do Rio Preto, SP, Brazil

e-mail: rahalp@yahoo.com.br

Abstract

Sexual transmission of Zika virus (ZIKV), an important arbovirus, and the persistence of this virus in semen brings raises several questions about how and where it circulates in the male reproductive tract (MRT). We analyzed the ZIKV infection in MRT of AG129 mice at 2 dpi, peak of viremia, and detected high RNA viral loads in testicles, epididymis and prostatic complex (prostate and seminal vesicle). Immunohistochemical (IHC) analyses, based on the envelope protein, showed an early infection in organs of MRT, since ZIKV positive antigens were detected in cells within or surrounding blood vessels, in interstitials regions or connective tissue of the organs and in epithelial cells of tissues. A more robust infection was seen in the testicles and epididymis at 2 dpi, in prostate it was also possible to observe the viral presence. Positive antigens for NS5 protein were also detected by IHC, the virus RNA-dependent RNA polymerase, suggesting that the virus replicates in these organs.

Keywords: Zika virus, ZIKV, male reproductive tract, MRT, mice, AG129

1. Introduction

Zika virus (ZIKV), an arbovirus member of *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus*, was first identified in 1957 from the blood of sentinel *Rhesus* monkeys in Zika forest of Uganda ¹. It has a positive-stranded RNA genome with about 10.8kb, containing only an open reading frame (ORF), flanked at both ends by untranslated regions (UTR) ^{2,3}. The ORF encodes a polyprotein that is processed in 3 structural proteins, capsid (C), pre-membrane (prM) and envelope (E), and 7 non-structural, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5 ^{3,4}. Until 2007, few cases of human infection by ZIKV were reported, however in that same year, an epidemic occurred in Yap Island, Federated States of Micronesia. Approximately three quarters of the local population showed Zika virus infection ⁵.

ZIKV infection is usually asymptomatic, but when symptoms occur, they are non-specific, like fever, rash, headache, non-purulent conjunctivitis, arthralgia, myalgia and asthenia ^{4,6}. This set of symptoms is similar to other arboviruses, as the disease caused by dengue virus (DENV) and Chikungunya (CHKV), making it difficult to diagnose ⁶. During the outbreak in French Polynesia in 2013/2014, Zika virus infections were associated with cases of neurological changes, like Guillain-Barré syndrome ^{7,8}.

The first autochthonous case in Brazil was reported in 2015 ⁹ and recent outbreaks in Central and South America demonstrated that the infection is associated with serious health conditions, such as cases of congenital Zika syndrome in fetus ¹⁰ and Guillain-Barré syndrome in adults ⁶.

Zika virus is mainly transmitted by mosquitoes from the genus *Aedes* ¹¹. Other forms of transmission that have been reported are blood transfusion ¹², perinatal route ¹³ and sexual transmission ¹⁴⁻¹⁶. Additionally, this virus is capable of causing a long-term persistence in semen ^{17,18} and was already isolated 370 days after the symptoms disappearance in a man ¹⁹.

Animal models have been utilized to investigate the infection in the male reproductive tract (MRT). In mice the most of the studies detected ZIKV in testicles

and epididymis, observed too inflammation in this organs ^{20,21} and the presence also it was detected in prostate and seminal vesicle, but in lesser level ²². In monkeys, it was found in testicles, prostate and seminal vesicle ²³. In this study, we analyzed the infection of Zika virus in different organs of male genital tract of AG129 mice, as well as brain and serum, at 2 days post infection, peak of viremia ²⁴, evaluating, thus, the initial ZIKV infection in MRT.

2. Material and Methods

2.1. Ethics statement

This study was submitted to the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of IBILCE / UNESP in São José do Rio Preto, SP, with approval nº 163/2017 - CEUA.

2.2. Cell culture

Vero E6 cells were growth in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 1000 U/mL penicillin-streptomycin, P/S (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. The mosquito C6/36 cell line (*Aedes albopictus*, Banco de células do Rio de Janeiro, BCRJ, Duque de Caxias, RJ, Brazil) was grown in Leibovitz L-15 medium (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 1000 U/mL penicillin-streptomycin, P/S (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in an incubator at 28°C.

2.3. Virus preparation

The Brazilian strain of Zika virus (ZIKV^{BR}) was isolated from a febrile case in the state of Paraíba ²⁵, northeastern Brazil, and it was a courtesy of. Dr. Pedro Vasconcelos, Evandro Chagas Institute, Brazil. A sample of this virus was inoculated in C6/36 cell and incubated for 5-6 days, until the onset of cytopathic effect. Cells were freezed and thawed and the supernatant was filtered and stored at -80°C.

2.4. Virus titration

Viral title was obtained by titration on Vero E6 cells. Vero E6 cells were seeded in 12-well plate (2×10^5 cells per well) and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24h prior to infection. The virus was diluted 10-fold in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil). Monolayers were infected with 400 µL of each dilution in duplicate for 1 hour at 37°C for viral adsorption. After this incubation, virus was removed and 950 µL of Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) 2x supplemented with 1% Fetal Bovine Serum (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 1% P/S (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and 1% carboxymethylcellulose sodium salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to each well. Cells were incubated for 96 hours at 37°C with 5% CO₂, fixed with 10% formaldehyde (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) and stained with 1% violet crystal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in 20% ethanol (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany). Foci were counted to obtain viral titer.

2.5. Animals

Eleven male AG129 mice at 7 weeks age were intradermally injected in the footpad with 1×10^5 PFU (plaque-forming units) of ZIKV^{BR} diluted in 50 µL of Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil). Animals were euthanized 2 days post infection (dpi), peak of viremia, according to Rossi et al.²⁴. Besides them, two uninfected mice were euthanized as negative control. Animals were euthanized by an overdose of the anesthetic Dopalen (Ketamine Hydrochloride, Agribands Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brazil) -500mg / kg, injected intraperitoneally.

Brain, testicles, epididymis, prostatic complex (prostate and seminal vesicle) and blood were collected. For Real time PCR (qPCR) 5 animals were used, 4 infected and 1 control. Six animals were used for immunohistochemistry (IHC), 5 infected and 1 control

Matrices (3 females and 1 male) of the eleven male animals used were obtained at the Bioterio of the University of São Paulo - Campus São Paulo, they were

courtesy of Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira, University of São Paulo - Brazil, and maintained in pathogen free conditions.

2.6. RNA extraction, cDNA synthesis and real time PCR

Total RNA from organs and serum was isolated by macerating the organs or mixed serum in TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and proceeding with RNA extraction according to manufacturer's instructions. The cDNA synthesis was done with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using 10 µL of extracted RNA.

Viral RNA levels of the serum, brain, testicles, epididymis and prostatic complex were determined by real time PCR technique using ZIKV 1086, ZIKV 1162c and 1107-FAM primers ²⁶ and TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The reaction was performed in QuantStudio™ 12K Flex Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Viral load of ZIKV^{BR} was expressed on a log10 scale as viral RNA total copies after comparison with standard curve, composed of 7 points, (Log10 - 1.6 x 10⁶ PFU / mL at 1.6 PFU / mL).

2.7. Histology and Immunohistochemistry

Tissues (brains, testicles, epididymis and prostate) from ZIKV-infected and uninfected AG129 mice were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in a phosphate buffer solution (PBS) for 24h washed in water, dehydrated in ethanol (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany), clarified in xylol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and included in Histosec (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) for block assembly. The paraffin blocks containing the tissue were sectioned at 5µm. Some slides were stained with hematoxylin-eosin (HE) for morphological and histopathological analyzes. The Immunohistochemistry Application Solutions Kit (Rabbit) (#13079, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) was used for immunohistochemistry staining. Tissues were deparaffinized and rehydrated. Antigen retrieval was performed in citrate buffer (pH 6) for 25 min at 98°C, followed by endogenous peroxidase block with Peroxide

Blocking Reagent (Previously Covance catalog # SIG-31128, BioLegend®, San Diego, CA, USA) for 10 minutes. Slides were washed with phosphate buffered saline + 0.025% of Triton-X (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (PBS-T). A *Goat Serum* 10% blocking solution (Introvigen, Carlsbad, CA, USA) was added for the blockage of nonspecific proteins for 2 hours at room temperature. The blocking solution was removed and slides were incubated with primary antibodies, NS5 antibody (NBP2-42900, rabbit, polyclonal, 1:500, Novus Biologicals®, Centennial, CO, USA) and Zika virus envelope protein (GTX133314, rabbit, polyclonal, 1:500, GeneTex, Irvine, CA, USA) and incubated for 2 hours at room temperature. Slides were washed three times with PBS-T and incubated for 30 minutes with SignalStain® Boost IHC Detection Reagent (HRP, Rabbit) (kit). The reaction was detected using diaminobenzidine (DAB) and counterstained with hematoxylin (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany). Slides were analyzed with the Olympus BX60 (Olympus, Tokyo, Japan) light microscope.

2.8. Data analysis

Data were first submitted to descriptive analysis for determination of normality. Once the normal distribution was confirmed, the groups were compared by analysis of variance (One-Way ANOVA) followed by the Bonferroni test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) was also used to aid in data processing.

3. Results

3.1. Zika virus was detected in high titers in male reproductive tract organs

The titers of ZIKV in the organs and serum at 2 dpi were evaluated by qPCR and the virus was detected in all organs analyzed. The higher titer was obtained in serum, followed by testicles, brain, epididymis and, the smaller titer was detected in prostatic complex. Figure 1 present the mean of the viral titer, measured by RNA copies, of each organ considering the four infected mice. Statistics differences were

obtained just by comparison between serum and all organs (P value < 0.0001). Comparisons between organs were not significant.

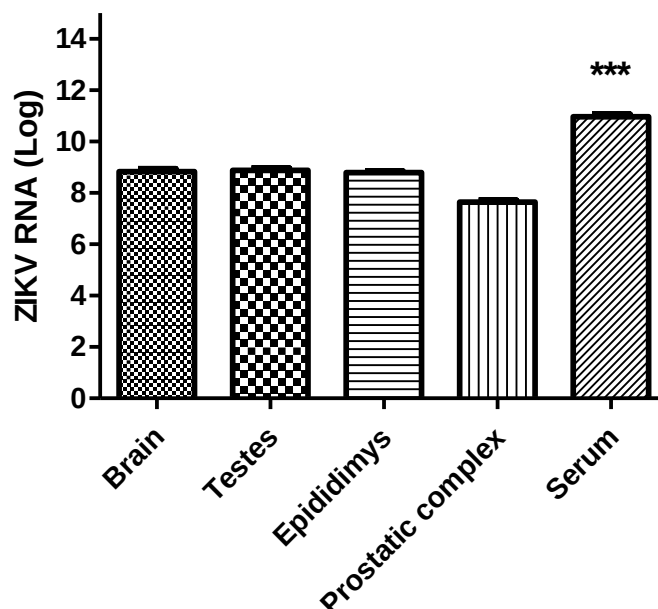


Figure 1. Mean of the ZIKV RNA titer in each organ/serum of four infected mice, measured by RNA copies, at 2 dpi (*** $p < 0.0001$). Viral loads in organs and serum were not detected in the uninfected mice.

3.2. MRT organs display an initial infection at 2 days post-infection by ZIKV

Sections of organs (brain, testicles, epididymis and prostate) of infected and of uninfected mice were analyzed after staining by immunohistochemistry in order to determine the location of the virus in these organs. To this end, we used one marker for the viral envelope structural protein and another for the NS5 nonstructural protein, which is the viral RNA polymerase. In general, ZIKV was detected at different points in the organs, being found often in or nearby blood vessels (Figures 2F, 4D-E, 5E, 7D, 7F, 8F, 9D-E, yellow arrows). These patterns indicate an initial infection in the tissues.

In the testicles, in addition to vessels (Figure 2F, yellow arrows), the virus was detected in Leydig cells, located in interstitial regions (Figures 3D-E, red arrows), demonstrating infection in the basal regions of some seminiferous tubules, in spermatogonias, spermatocytes and Sertoli cells (Figures 2D-F; 3D-F) and also in myoid cells (2F, green arrows) presenting immunoreactivity for both antibodies. Regarding the epididymis, in most of the analyzed mice the immunoreaction was observed at more basal cells in the epididymal epithelium (Figures 4D-F; 5F), some in the connective tissue (Figures 4D-E, orange arrows) and others in smooth muscle cells of this organ. However, in some cases NS5 protein was shown to be more immunoreactively in the epithelium (Figure 5D). The prostate showed a lower immunoreactivity to ZIKV compared to the testicles and epididymis, the ZIKV presence in the glandular epithelium, also in a basal region, can be detected (Figures 6D-F). NS5 protein, in this organ, was detected mainly within blood vessels (Figure 7F, yellow arrows) and in interstitial regions (Figures 7D; 7F), while in the tissue itself (Figure 7E), it was also observed, but in smaller amount. The orange arrow (Figure 7F) demonstrates a leucocyte positive for NS5 antigen transmigrating from the blood vessel into the connective tissue, overcoming the endothelial barrier.

In the brain, which was used as a positive control of the experiment, due to ZIKV known tropism to this organ²⁷, we observed more immunoreactivity to NS5 protein antigen than to the envelope antigen (Figure 9). In relation to the last one, a few positive cells to Zika virus could be found, such as neuron (Figure 8D), a cell in granular layer (Figure 8E) and also around a blood vessel (Figure 8F, yellow arrows). Immunoreaction to NS5 protein was found mainly within blood vessels (Figures 9D-E, yellow arrows), but also in cerebral cortex (Figure 9D) and granular layer (Figure 9F)

3.3. ZIKV replicates in the organs of MRT.

NS5 protein of *Flavivirus*, like *Zika virus*, is the RNA-dependent RNA polymerase²⁸ and in this study we used a specific antibody for this protein in the immunohistochemistry assay. As previously described, all organs analyzed showed immunoreactivity for this antigen at 2 dpi. Although many positive leukocytes for

this antibody were found within blood vessels in the organs (Figures 5C; 7F; 9D-E), we can also see positive cells in the tissue (Figures 3D-F; 5D; 5F; 7F; 9D; 9F), mainly in testicles and epididymis. These findings evidences that ZIKV is replicating in this organs early, at 2 days post infection. In prostate tissue, comparing to testicles and epididymis, there were fewer NS5 positive sites, nevertheless it was still possible to detect immunoreactivity to this protein, also confirming an early replication in prostate cells.

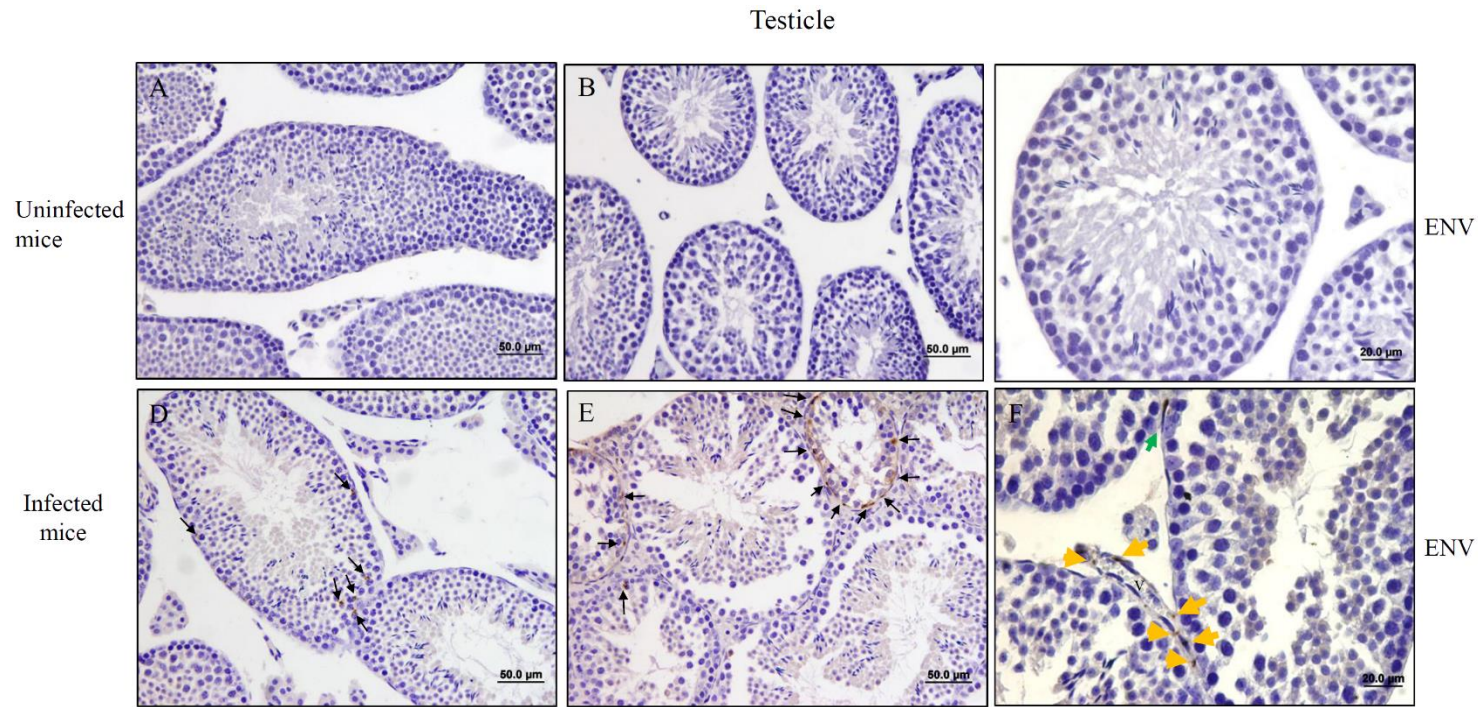


Figure 2. Photomicrograph of the ZIKV envelope protein antigens in testicles. **A-C:** Control testicles from uninfected AG129. Polyclonal anti-Zika virus envelope protein; counterstained hematoxylin; A and B: 20x, bar = 50μm; C= 40x, bar = 20μm. **D – F:** testis of AG129 infected with ZIKV, 2 dpi; Polyclonal anti-Zika virus envelope protein (ENV); counterstained hematoxylin; D and E: 20x, bar = 50μm; F = 40x, bar = 20μm. **D – E:** Seminiferous tubules showed immunoreactivity to ZIKV in some cells in basal sites. **F:** ZIKV antigen in surrounding of blood vessels and also in basal region of seminiferous tubules. polyclonal antibody. Black arrows = epithelial cells. Green arrow = Myoid cell. Yellow arrows = cells within or surrounding of blood vessels. v= blood vessels.

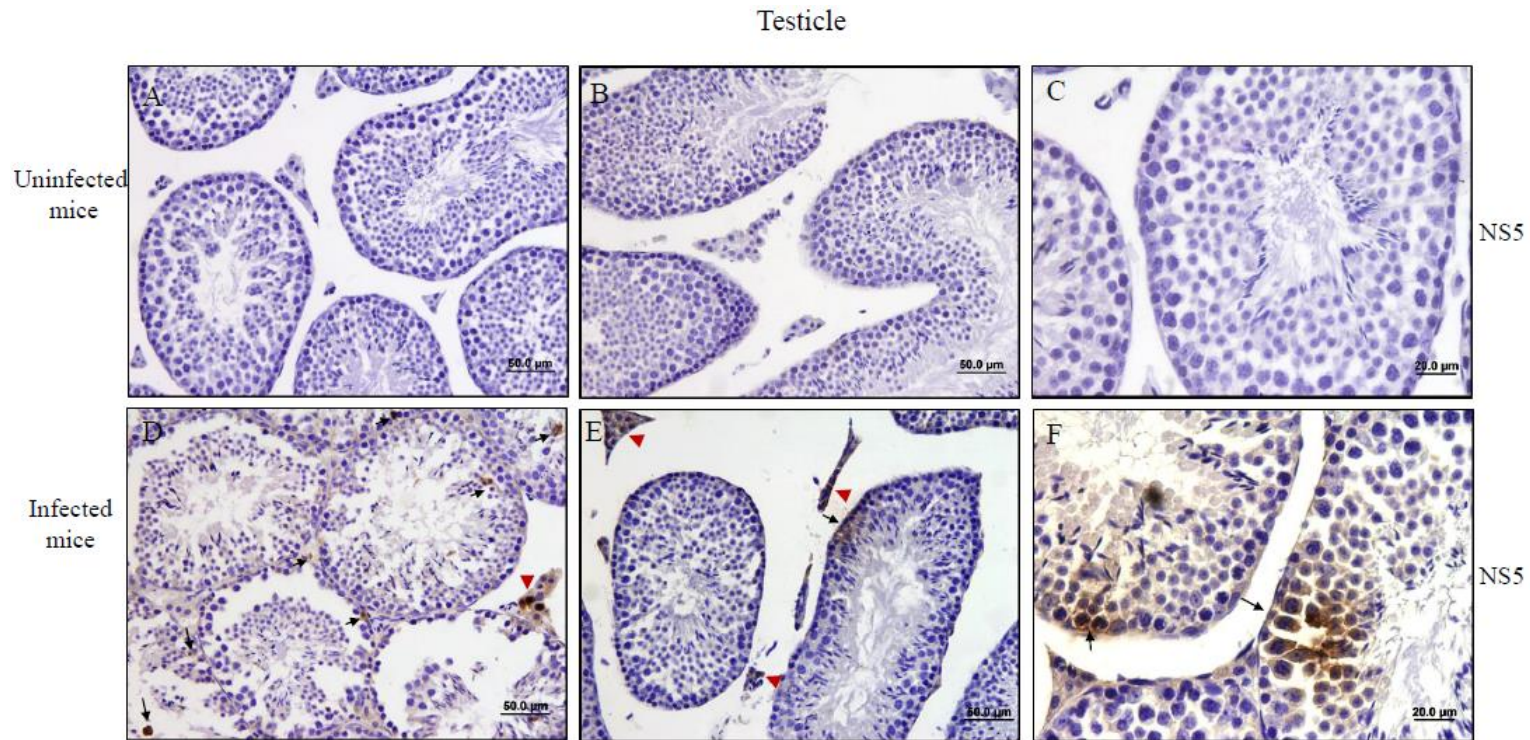


Figure 3. Photomicrograph of the *Flavivirus* NS5 protein antigens in testicles. **A-C:** Control testicles from uninfected AG129. Polyclonal anti-NS5 protein (NS5); counterstained hematoxylin; A and B: 20x, bar = 50μm; C= 40x, bar = 20μm. **D – F:** testis of AG129 infected with ZIKV, 2 dpi; Polyclonal anti-NS5 protein (NS5); counterstained hematoxylin; D and E: 20x, bar = 50μm; F = 40x, bar = 20μm. **D – E:** Seminiferous tubules showed immunoreactivity to NS5 protein of ZIKV in some epithelial and interstitial cells. **F:** NS5 protein antigen in epithelial cells of seminiferous tubules. Black arrows = epithelial cells. Red arrow = Interstitial cells.

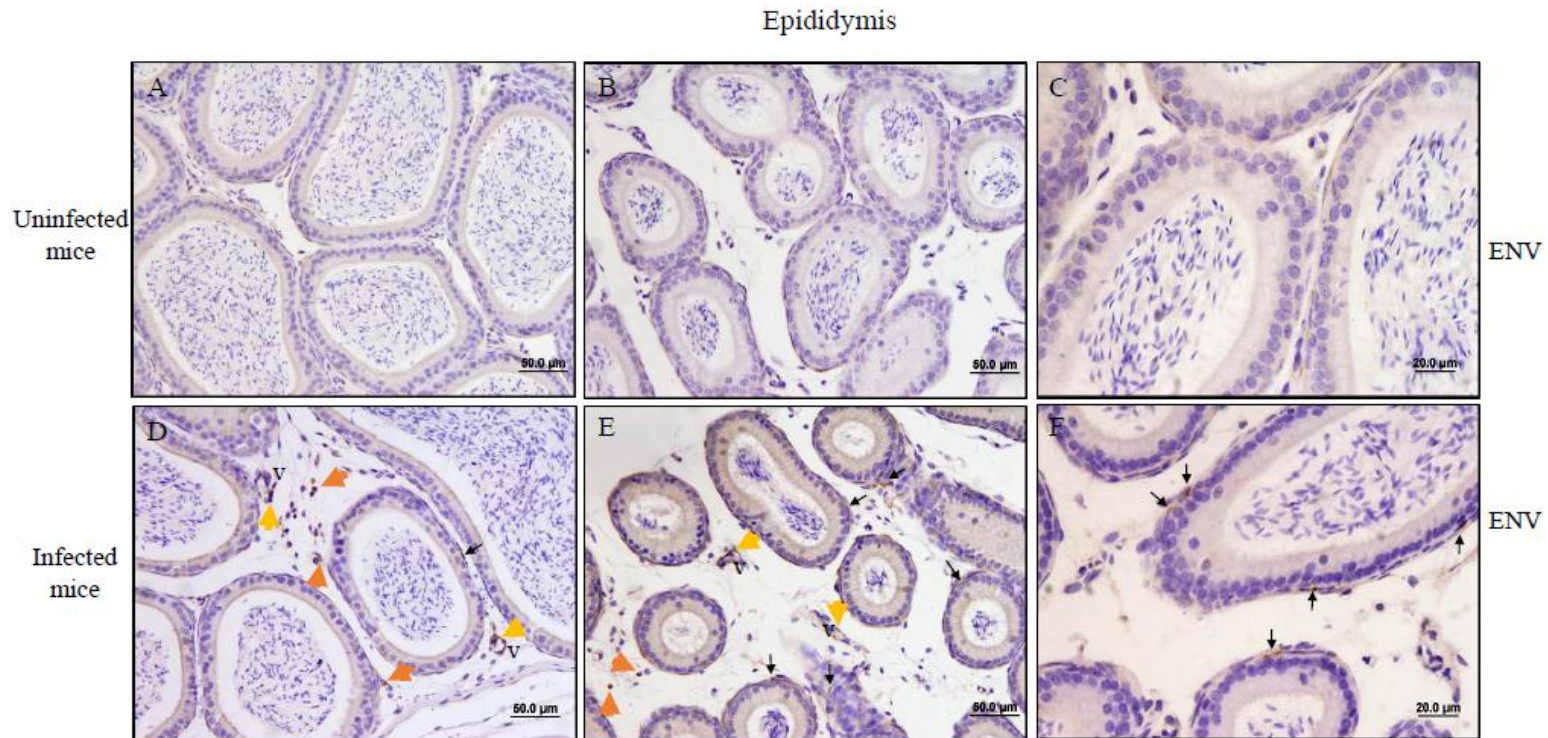


Figure 4. Photomicrograph of the ZIKV envelope protein antigens in epididymis. **A-C:** Control epididymis from uninfected AG129. Polyclonal anti-Zika virus envelope protein (ENV); counterstained hematoxylin; A and B: 20x, bar = 50μm; C= 40x, bar = 20μm. **D – F:** epididymis of AG129 infected with ZIKV, 2 dpi; Polyclonal anti-Zika virus envelope protein; counterstained hematoxylin; D and E: 20x, bar = 50μm; F = 40x, bar = 20μm. **D – E:** Cells in connective tissue, surrounding of blood vessels and some epithelial cells showed immunoreactivity to ZIKV. **F:** ZIKV antigen in some basal cells in epithelium of epididymis. Black arrows = epithelial cells. Orange arrows = cells of connective tissue. Yellow arrows = cells within or surrounding of blood vessels. v = blood vessel.

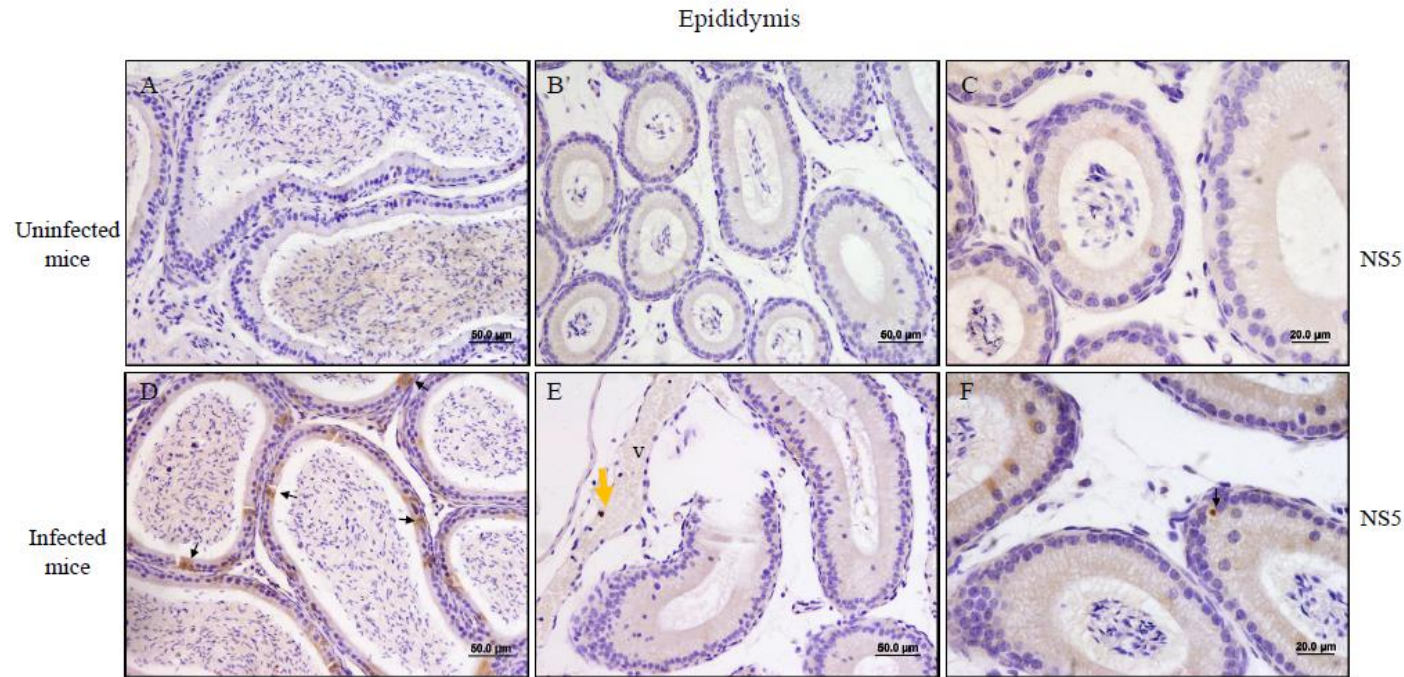


Figure 5. Photomicrograph of the *Flavivirus* NS5 protein antigens in epididymis. **A-C:** Control epididymis from uninfected AG129. Polyclonal anti-NS5 protein (NS5); counterstained hematoxylin; A and B: 20x, bar = 50µm; C= 40x, bar = 20µm. **D – F:** epididymis of AG129 infected with ZIKV, 2 dpi; Polyclonal anti-NS5 protein; counterstained hematoxylin; D and E: 20x, bar = 50µm; F = 40x, bar = 20µm. **D:** Transverse cells in the epithelium positive for NS5 protein of ZIKV antigen. **E:** Cell within blood vessels showed immunoreactivity to NS5. **F:** Epithelial cell positive for NS5 antigen. Black arrows = epithelial cells. Yellow arrows = cells within or surrounding of blood vessels. v = blood vessels.

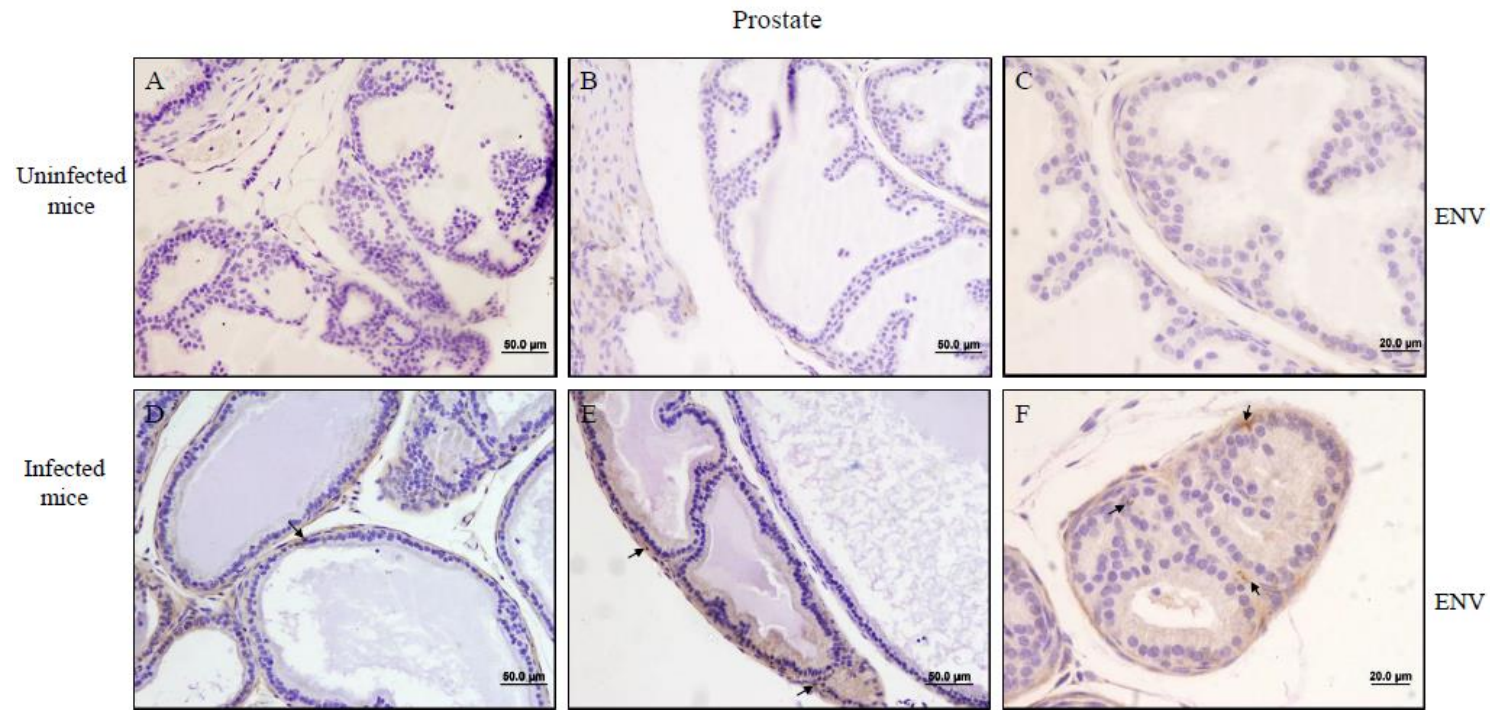


Figure 6. Photomicrograph of the ZIKV envelope protein antigens in prostate. **A-C:** Control prostate from uninfected AG129. Polyclonal anti-Zika virus envelope protein (ENV); counterstained hematoxylin; A and B: 20x, bar = 50μm; C= 40x, bar = 20μm. **D – F:** prostate of AG129 infected with ZIKV, 2 dpi; Polyclonal anti-Zika virus envelope protein; counterstained hematoxylin; D and E: 20x, bar = 50μm; F = 40x, bar = 20μm. **D – E:** Cells of basal region of epithelium showed immunoreactivity to ZIKV. **F:** ZIKV antigen positive in some cells in epithelium of prostate. Black arrows = epithelial cells.

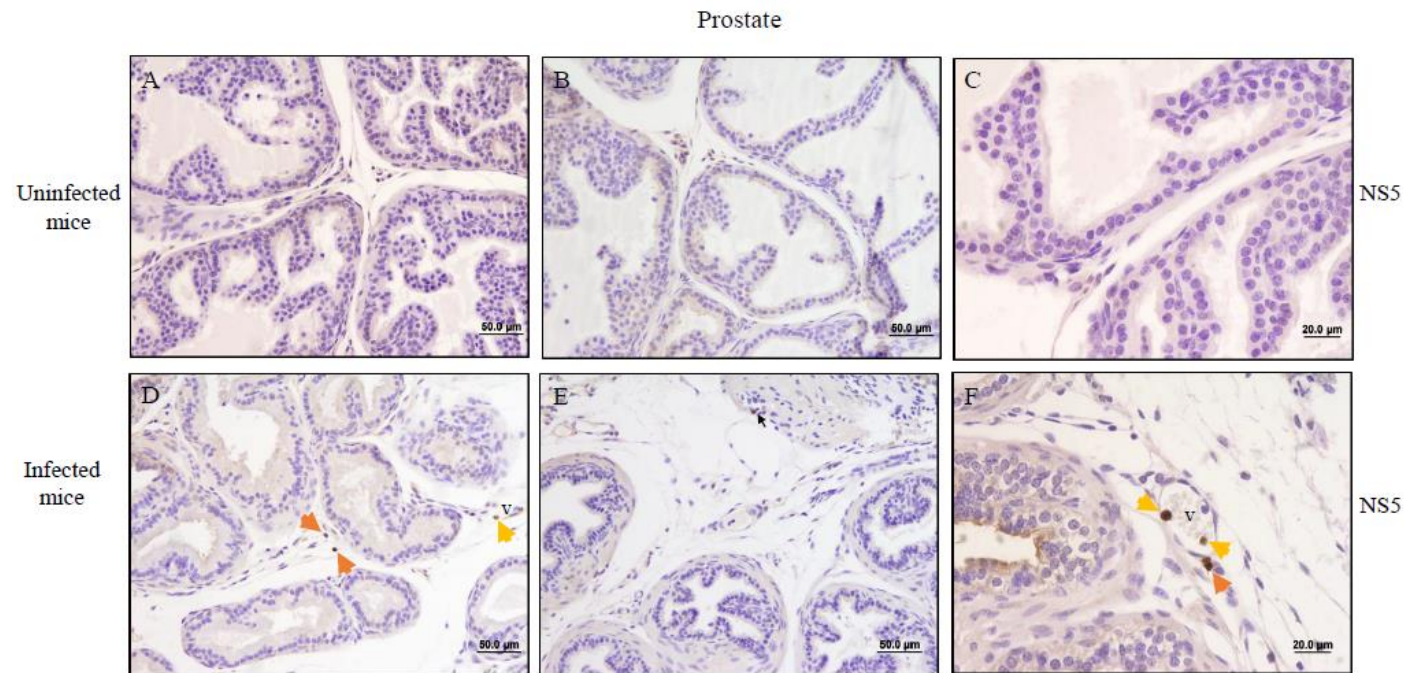


Figure 7. Photomicrograph of the *Flavivirus* NS5 protein antigens in prostate. **A-C:** Control prostate from uninfected AG129. Polyclonal anti-NS5 protein (NS5); counterstained hematoxylin; A and B: 20x, bar = 50µm; C= 40x, bar = 20µm. **D – F:** prostate of AG129 infected with ZIKV, 2 dpi; Polyclonal anti-NS5 protein; counterstained hematoxylin; D and E: 20x, bar = 50µm; F = 40x, bar = 20µm. **D:** Cells of connective tissue positive for NS5 antigen. **E:** Epithelial cell showed immunoreactivity to NS5 protein of ZIKV. **F:** NS5 antigen positive in some cells within blood vessels and in connective tissue. Black arrows = epithelial cells. Orange arrows = cells of connective tissue. Yellow arrows = cells within or surrounding of blood vessels. v = blood vessels.

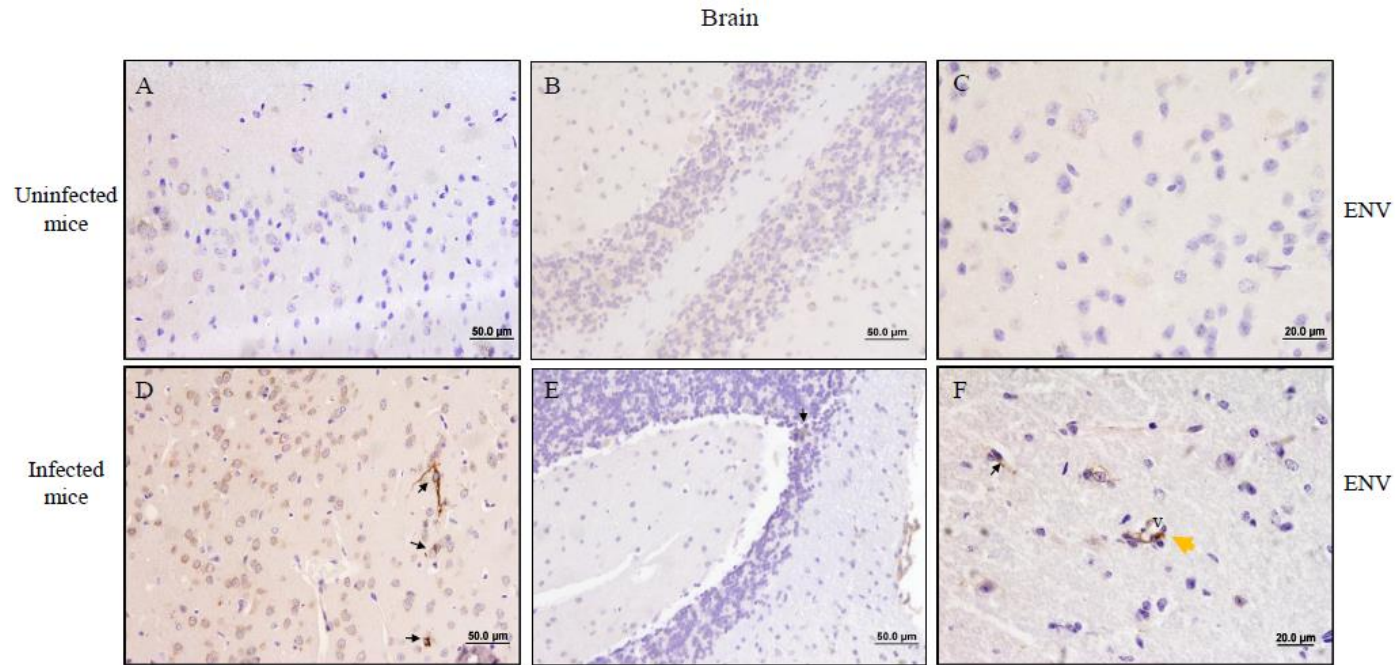


Figure 8. Photomicrograph of the ZIKV envelope protein antigens in brain. **A-C:** Control brain from uninfected AG129. Polyclonal anti-Zika virus envelope protein (ENV); counterstained hematoxylin; A and B: 20x, bar = 50μm; C= 40x, bar = 20μm. **D – F:** brain of AG129 infected with ZIKV, 2 dpi; Polyclonal anti-Zika virus envelope protein; counterstained hematoxylin; D and E: 20x, bar = 50μm; F = 40x, bar = 20μm. **D:** Neuron that showed immunoreactivity to ZIKV. **E:** positive cell to ZIK antigen in granular layer. **F:** ZIKV antigen positive surrounding a blood vessel in brain cortex. Yellow arrows = cells within or surrounding of blood vessels. v = blood vessel.

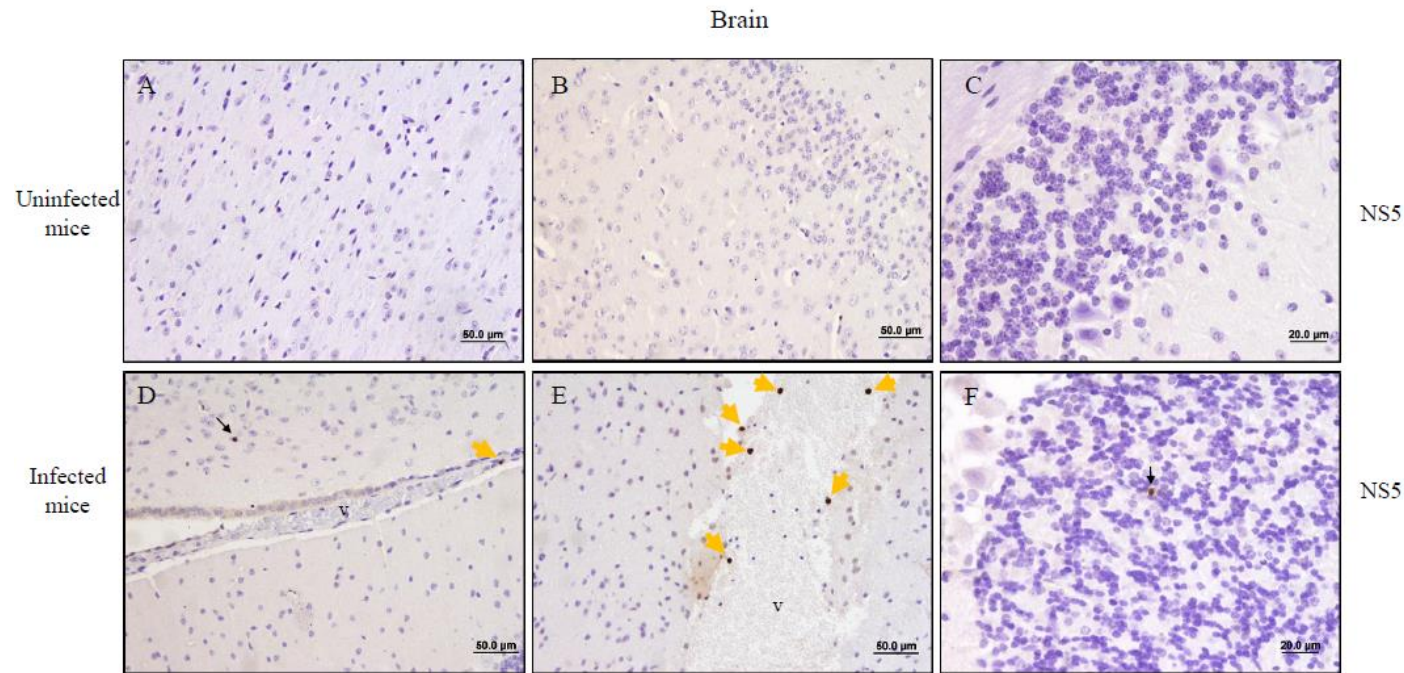


Figure 9. Photomicrograph of the *Flavivirus* NS5 protein antigens in brain. **A-C:** Control brain coming from uninfected AG129. Polyclonal anti-NS5 protein (NS5); counterstained hematoxylin; A and B: 20x, bar = 50μm; C= 40x, bar = 20μm. **D – F:** brain of AG129 infected with ZIKV, 2 days' post infection; Polyclonal anti-NS5 protein; counterstained hematoxylin; D and E: 20x, bar = 50μm; F = 40x, bar = 20μm. **D:** Cell of brain cortex and in blood vessel positive for NS5 antigen. **E:** Many cells within blood vessels showed immunoreactivity to NS5 protein of ZIKV. **F:** NS5 antigen positive in granular layer. Yellow arrows = cells within or surrounding of blood vessels. v = blood vessel.

4. Discussion

Due to reports of ZIKV sexual transmission^{14-16,29} and data that showed the persistence of ZIKV in semen in high viral titers¹⁷⁻¹⁹, it is necessary to study the infection of this virus in male genital tract. In this study, we focused in studying an early ZIKV infection, of the MRT, in 7 weeks-old AG129 mice. For this, we infected the animals and the euthanasia occurred on peak of viremia, at 2 days-post infection, and the infection in MRT was analyzed by qPCR and immunohistochemistry.

By Real time PCR we verified the presence of ZIKV in all analyzed organs (testicles, epididymis, prostatic complex and brain) and serum in high titers of viral RNA at 2 dpi. The peak of viremia at 2 dpi was described in a study that used A129 mice, that are lacking of IFN type I gene, and AG129, lacking of IFN type I and II genes, that were infected with ZIKV. They found the viral presence in several organs of infected A129, including the testicles, where they verified high viral titers, but other organs of the MRT were not analyzed²⁴.

Other study, based on AG129 lineage of mouse, detected Asiatic and one African strains of Zika virus in testicles, epididymis and seminal vesicle with high levels of viral RNA³⁰. Other group demonstrated ZIKV presence in testicles and epididymis at 7, 9, 10 and 11dpi, but also in prostate and seminal vesicle at 7, 9 and 11 dpi, in 7 to 8 weeks-old AG129 mice, using by qPCR²². Low viral titers were found in prostate and seminal vesicle of C57BL/6 rats, while testicles and epididymis demonstrated high RNA viral load²⁰.

Our results of qPCR are in accordance with many studies found in literature, as most presented here. Some differences, such as of Ma et al.²⁰, who observed low viral loads of RNA in the prostate and seminal vesicles may have occurred due to differences between the animal model, the ZIKV strain or even the dose of infection^{22,31-34}.

Regarding the immunohistochemical results, we could observe an initial infection in the tissue of organs of MRT (testicles, epididymis and prostate), as well

as in the brain. Immunoreactivity to Zika virus envelope protein and NS5 protein, can be seen many times within or around the blood vessels, but it is also found inside the tissues. In testicles, we found viral antigens in interstitial cells (Leydig cells) and in some basal cells in seminiferous tubules, where we can observe immunoreactivity in myoid cells, Sertoli cells, spermatocytes and spermatogonias even in this initial infection.

The preference of ZIKV infection in spermatogonia, spermatocytes and Sertoli cells had previously been reported in mice wild type (WT) at 7dpi ³¹. Other study also in WT mice, verified that myoid cells and spermatogonia are more susceptible to Zika virus infection, because this virus did not induce a fast and abundant response of cytokines in this cells. Also, in Leydig cells and epithelial cells of epididymis, the virus induced innate immune response, leading to synthesis of pro-inflammatory cytokines ²⁰.

In a study that analyzed the infection in cells of testis in two types of mice, a immunocompetent and a immunocompromised they observed that the germ cells in both models were equally susceptible to ZIKV infection. Sertoli cells and myoids cells did not show significant differences between them. Leydig cells did not exhibit susceptibility to this virus in any model ³⁵. Another research identified Sertoli cells as susceptible to Zika virus both in animal model (AG6 mice) and cell culture ³⁶.

Our findings in epididymis demonstrate positive cells for ZIKV antigens in some basal cells in epididymal epithelium, but increased immunoreactivity in epithelial cells of this organs in many cases can be seen in figure 5D. A similar pattern has been seen by Clancy et al. ²² in AG219 mice at 5dpi, however they have observed this immunoreactivity more intensely. They also identified that epithelial constituents in MRT were the first cells to keep the ZIKV infection and described that the infection in epididymal tubular epithelial cells were the most robust infection in male reproductive tract and the one that is detected earlier at 5dpi by immunohistochemistry ²². In our study, despite being a very initial infection, at 2 dpi, we found a greater infection in the epididymis, but also in the testes.

Findings of McDonald et al.³⁷ verified that epithelial cells of epididymis were the main origin of negative-strand of ZIKV (replication intermediary) in male urogenital tract. The significative presence of positive NS5 antigen in epididymal epithelium (Figure 5D) may be an indication of this in the present study. The authors also demonstrated the presence of ZIKV negative strand in leukocytes and the replication in this cells together with epithelial cells of the epididymis had correlation with the peak of potential sexual transmission. These cells can be, then, the main origin of ZIKV in semen³⁷. We also had evidences of replication of ZIKV in leukocytes in MRT, due to immunoreactivity to NS5 antigen, the RNA-dependent RNA polymerase of *Flavivirus*, detected by immunohistochemistry in epididymis, testis and prostate.

Even though most of the studies suggested that the testis and epididymis are the main organs in which the ZIKV replicates, cases of vasectomized men in whom the presence of ZIKV was detected in the semen³⁸⁻⁴⁰ demonstrate that Zika virus can be replicating in other sites. When a man undergoes a vasectomy, the ductus deferens are cut, so the communication between epididymis and testis with the rest of MRT is ceased, so the viral replication in this organs would not be detected in semen³⁴. Thus, accessory glands such as the prostate may be potential replication sites.

Cells lineages of human prostate, the 19I (prostate stroma) and LNCaP (prostate epithelial adenocarcinoma cells) and prostate organoids composed of these two cell lines showed that they were permissive to infection and replication of ZIKV³⁴. Our results in prostate analysis by IHC demonstrated that this organ may be a replication site due to immunoreactivity to NS5 protein in few epithelial regions, but the infection time was short for further conclusions.

We detected high titers of ZIKV RNA in all organs analyzed of male reproductive tract at 2 days post-infection of AG129 mice. By immunohistochemistry, we observed the immunoreactivity for viral antigens for many times next to or within blood vessels, but also an initial infection in interstitial regions and tissues of MRT organs. In testis, Leydig cells, Sertoli cells,

spermatogonia and spermatocytes were positive for ZIKV antigens, while in the epididymis ZIKV was present in connective tissue cells and in the epithelium. Prostate cells demonstrated less immunoreactivity, but ZIKV can also be seen in connective tissue cells and some epithelial cells. Besides that, positive anti-NS5 in leukocytes within blood vessels, and in interstitial and epithelial cells in analyzed organs of MRT suggests that the ZIKV can replicate in this cells and in the testis and epididymis, mainly, due to major immunoreactivity to NS5, but also prostate may be a replication site of this virus. Here we showed an initial infection by ZIKV in male genital tract of immunocompromised mice.

5. Conclusion

We verified that Zika virus was capable to infect testicles, epididymis and prostatic complex, organs of male reproductive tract, in high load of viral RNA at 2 days' post-infection. We observed the ZIKV antigens in Leydig cells, Sertoli cells, spermatogonias and spermatocytes, cells of testicle. In epididymis and prostate they were found in cells of connective tissue and epithelial cells, although with lower levels in the latter. Immunoreactivity to ZIKV antigens was observed in leukocytes within blood vessels and in cells surroundings these vessels. We suggest that the ZIKV may be replicating in these MRT organs analyzed, due to the positive antigens to RNA polymerase viral, the NS5 protein.

More studies are necessary to better clarify the infection in MRT, an important issue due to sexual transmission cases and persistence of this virus in semen. Understanding the behavior of ZIKV infection in MRT in early stages of infection might aid the development of drugs and vaccines directed to the treatment of Zika virus infection in this system.

Funding

This study was supported by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) and “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES).

6. References

- 1 Dick, G. W., Kitchen, S. F. & Haddow, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 509-520 (1952).
- 2 Kuno, G. & Chang, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of virology* **152**, 687-696, doi:10.1007/s00705-006-0903-z (2007).
- 3 Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. & Rice, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual review of microbiology* **44**, 649-688, doi:10.1146/annurev.mi.44.100190.003245 (1990).
- 4 Ye, Q. *et al.* Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **43**, 43-49, doi:10.1016/j.meegid.2016.05.004 (2016).
- 5 Duffy, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England journal of medicine* **360**, 2536-2543, doi:10.1056/NEJMoa0805715 (2009).
- 6 Araujo, L. M., Ferreira, M. L. & Nascimento, O. J. Guillain-Barre syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arquivos de neuro-psiquiatria* **74**, 253-255, doi:10.1590/0004-282X20160035 (2016).
- 7 Oehler, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **19** (2014).
- 8 Cao-Lormeau, V. M. *et al.* Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* **387**, 1531-1539, doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6 (2016).
- 9 Zanluca, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **110**, 569-572, doi:10.1590/0074-02760150192 (2015).
- 10 Fauci, A. S. & Morens, D. M. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. *The New England journal of medicine* **374**, 601-604, doi:10.1056/NEJMp1600297 (2016).
- 11 Vasconcelos, P. F. & Calisher, C. H. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000-2016. *Vector borne and zoonotic diseases* **16**, 295-301, doi:10.1089/vbz.2016.1952 (2016).
- 12 Musso, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **19** (2014).
- 13 Besnard, M., Lastere, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. & Musso, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro surveillance : bulletin European*

- sur les maladies transmissibles = *European communicable disease bulletin* **19** (2014).
- 14 Foy, B. D. *et al.* Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerging infectious diseases* **17**, 880-882, doi:10.3201/eid1705.101939 (2011).
 - 15 Deckard, D. T. *et al.* Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus--Texas, January 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **65**, 372-374, doi:10.15585/mmwr.mm6514a3 (2016).
 - 16 Musso, D. *et al.* Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging infectious diseases* **21**, 359-361, doi:10.3201/eid2102.141363 (2015).
 - 17 Atkinson, B. *et al.* Detection of Zika Virus in Semen. *Emerging infectious diseases* **22**, 940, doi:10.3201/eid2205.160107 (2016).
 - 18 Nicastrì, E. *et al.* Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **21**, doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.32.30314 (2016).
 - 19 Barzon, L. *et al.* Virus and Antibody Dynamics in Travelers With Acute Zika Virus Infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **66**, 1173-1180, doi:10.1093/cid/cix967 (2018).
 - 20 Ma, W. *et al.* Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell* **167**, 1511-1524 e1510, doi:10.1016/j.cell.2016.11.016 (2016).
 - 21 Uraki, R. *et al.* Zika virus causes testicular atrophy. *Science advances* **3**, e1602899, doi:10.1126/sciadv.1602899 (2017).
 - 22 Clancy, C. S., Van Wettere, A. J., Siddharthan, V., Morrey, J. D. & Julander, J. G. Comparative Histopathologic Lesions of the Male Reproductive Tract during Acute Infection of Zika Virus in AG129 and Ifnar(-/-) Mice. *The American journal of pathology* **188**, 904-915, doi:10.1016/j.ajpath.2017.12.019 (2018).
 - 23 Osuna, C. E. *et al.* Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. *Nature medicine* **22**, 1448-1455, doi:10.1038/nm.4206 (2016).
 - 24 Rossi, S. L. *et al.* Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **94**, 1362-1369, doi:10.4269/ajtmh.16-0111 (2016).
 - 25 Faria, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **352**, 345-349, doi:10.1126/science.aaf5036 (2016).
 - 26 Lanciotti, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases* **14**, 1232-1239, doi:10.3201/eid1408.080287 (2008).
 - 27 Dick, G. W. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 521-534 (1952).
 - 28 Knipe, D. M. & Howley, P. M. *Fields Virology*. Vol. I (2013).

- 29 Yarrington, C. D., Hamer, D. H., Kuohung, W. & Lee-Parritz, A. Congenital Zika syndrome arising from sexual transmission of Zika virus, a case report. *Fertility research and practice* **5**, 1, doi:10.1186/s40738-018-0053-5 (2019).
- 30 McDonald, E. M., Duggal, N. K. & Brault, A. C. Pathogenesis and sexual transmission of Spondweni and Zika viruses. *PLoS neglected tropical diseases* **11**, e0005990, doi:10.1371/journal.pntd.0005990 (2017).
- 31 Govero, J. *et al.* Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature* **540**, 438-442, doi:10.1038/nature20556 (2016).
- 32 Lazear, H. M. *et al.* A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell host & microbe* **19**, 720-730, doi:10.1016/j.chom.2016.03.010 (2016).
- 33 Dowall, S. D. *et al.* Lineage-dependent differences in the disease progression of Zika virus infection in type-I interferon receptor knockout (A129) mice. *PLoS neglected tropical diseases* **11**, e0005704, doi:10.1371/journal.pntd.0005704 (2017).
- 34 Spencer, J. L. *et al.* Replication of Zika Virus in Human Prostate Cells: A Potential Source of Sexually Transmitted Virus. *The Journal of infectious diseases* **217**, 538-547, doi:10.1093/infdis/jix436 (2018).
- 35 Robinson, C. L. *et al.* Male germ cells support long-term propagation of Zika virus. *Nature communications* **9**, 2090, doi:10.1038/s41467-018-04444-w (2018).
- 36 Sheng, Z. Y. *et al.* Sertoli Cells Are Susceptible to ZIKV Infection in Mouse Testis. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **7**, 272, doi:10.3389/fcimb.2017.00272 (2017).
- 37 McDonald, E. M., Duggal, N. K., Ritter, J. M. & Brault, A. C. Infection of epididymal epithelial cells and leukocytes drives seminal shedding of Zika virus in a mouse model. *PLoS neglected tropical diseases* **12**, e0006691, doi:10.1371/journal.pntd.0006691 (2018).
- 38 Arsuaga, M., Bujalance, S. G., Diaz-Menendez, M., Vazquez, A. & Arribas, J. R. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. *The Lancet. Infectious diseases* **16**, 1107, doi:10.1016/S1473-3099(16)30320-6 (2016).
- 39 Atkinson, B. *et al.* Presence and Persistence of Zika Virus RNA in Semen, United Kingdom, 2016. *Emerging infectious diseases* **23**, 611-615, doi:10.3201/eid2304.161692 (2017).
- 40 Froeschl, G. *et al.* Long-term kinetics of Zika virus RNA and antibodies in body fluids of a vasectomized traveller returning from Martinique: a case report. *BMC infectious diseases* **17**, 55, doi:10.1186/s12879-016-2123-9 (2017).

CAPÍTULO III

Conclusão

1. CONCLUSÃO

A realização deste trabalho foi importante para análise de uma infecção inicial de *Zika virus* no sistema genital masculino de camundongos AG129. Detectou-se a presença deste vírus em testículos, epidídimos e complexo prostático (próstata e vesícula seminal), órgãos do sistema genital masculino, em alto títulos de RNA viral a 2 dias pós-infecção. Análises imuno-histoquímicas demonstraram que antígenos positivos para ZIKV foram observados muitas vezes dentro de vasos sanguíneos, em leucócitos, ou no entorno desses vasos em todos os órgãos analisados. Já nos tecidos, pode-se observar a imunorreatividade para ZIKV em células intersticiais (células de Leydig), células de Sertoli, espermatogônias e espermátócitos nos testículos. No epidídimo, a infecção foi vista em células do tecido conjuntivo e, de forma mais significativa, em células epiteliais. Com relação à próstata, antígenos positivos para ZIKV foram encontrados em menor frequência do que nos testículos e epidídimos, mas puderem ser vistos também em células no tecido conjuntivo e em algumas células do epitélio glandular prostático.

A imunorreatividade para a proteína não-estrutural NS5, a RNA polimerase RNA-dependente de *Flavivirus*, em todos os órgãos analisados, assim como em leucócitos no interior de vasos sanguíneos, sugere que o vírus podem estar se replicando nestes locais.

Mais estudos são necessários para melhor esclarecer a infecção no sistema genital e isto importante devido aos casos de transmissão sexual de ZIKV, assim como a longa persistência deste vírus no sêmen. Maiores esclarecimentos se fazem necessários para o desenvolvimento de vacinas e terapias direcionadas a estes sítios específicos de infecção do *Zika virus*.