



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

Isabela Andrade de Camargo

Investigação da resposta inflamatória disparada pela proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus da Zika (ZIKV) e da Dengue (DENV) em modelos experimentais de epididimite murina

Botucatu-SP

2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

Isabela Andrade de Camargo

Investigação da resposta inflamatória disparada pela proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus da Zika (ZIKV) e da Dengue (DENV) em modelos experimentais de epididimite murina

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Candidata: Isabela Andrade de Camargo

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

Botucatu-SP

2024

C172i Camargo, Isabela Andrade de
Investigação da resposta inflamatória disparada pela proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus da Zika (ZIKV) e da Dengue (DENV) em modelos experimentais de epididimite murina / Isabela Andrade de Camargo. -- Botucatu, 2024
107 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Erick José Ramo da Silva

1. Epidídimo. 2. Epididimite viral. 3. Inflamação. 4. NS1-DENV. 5. NS1-ZIKV. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ISABELA ANDRADE DE CAMARGO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 24 dias do mês de maio do ano de 2024, às 09:00 horas, no(a) Sala de pós-graduação da Central de Aulas, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ISABELA ANDRADE DE CAMARGO, intitulada **Investigação da resposta inflamatória disparada pela proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus da Zika (ZIKV) e da Dengue (DENV) em modelos experimentais de epididimite murina..** A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. ERICK JOSÉ RAMO DA SILVA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biofísica e Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp, Pesquisadora Dr^a. ADA MARIA DE BARCELOS ALVES (Participação Presencial) do(a) Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz, Prof. Dr. LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. ERICK JOSÉ RAMO DA SILVA

Auxílio Financeiro

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(Processo 88887.670861/2022-00)

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(Processos 2021/04746-3 e 2021/06718-7)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Rinaldo Aparecido de Camargo e Mirian Araújo de Andrade, por terem me apoiado em todas as etapas da minha vida e me auxiliado a conquistar meus sonhos e nunca desistir. Sou extremamente honrada por ter vocês dois como exemplo de vida, e agradeço a Deus todos os dias por ter me dado o privilégio de tê-los como meus pais.

Agradeço a minha irmã, Giovana Andrade de Camargo, por me ajudar em todos os momentos da vida, me acalmando quando preciso, e vibrando a cada momento de conquista. Você é e sempre será um orgulho para mim, minha companheira de vida por toda a eternidade.

Agradeço aos meus avós, Divani Araújo de Andrade e Manoel Thiago de Andrade, que sempre cuidaram de mim, me ajudaram e me apoiaram quando preciso. Parte do que sou hoje devo a vocês, vocês são uma grande inspiração! Também agradeço à minha tia, Patrícia Araújo de Andrade, que mesmo distante fisicamente, se fez presente vibrando a cada conquista que tive, além de sempre estar me apoiando e ajudando em minhas decisões profissionais e pessoais.

Agradeço ao meu namorado, Yago Henrique Turatto Barão, por todo amor, carinho, paciência e companheirismo oferecidos em todos os momentos que passamos juntos. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e ajudando sempre que necessário. Sou muito grata a Deus por ter você em minha vida.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, Alexandre Dorth de Andrade, Noemia Aparecida Partelli Mariani, Natalia Calixto Miranda Santos, Poliana Veneziano Martini, Beatriz Rezende Santos, Juliana Bizzotto, Giulia Calderaro e Célio Junior da Costa Fernandes, por me ajudarem em cada processo de elaboração desta pesquisa, por vibrarem a cada nova conquista, por auxiliarem nos momentos difíceis e proporcionarem ótimos momentos durante meu mestrado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva, por me auxiliar em cada etapa de elaboração da minha pesquisa, e por sempre acreditar em meu potencial, até mesmo nos momentos em que as coisas pareciam não fazer sentido. Obrigada por ser um orientador presente, e um excelente mestre. Seus ensinamentos foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional, sou uma grande admiradora de seu trabalho e sou extremamente grata por ter tido a honra de ser orientada pelo senhor.

Agradeço a Dra. Naphak Modhiran e ao Dr. Alberto Amarilla Ortiz, pesquisadores da Universidade de Queensland na Austrália, por cederem as proteínas recombinantes utilizadas no presente projeto, e por toda parceria estabelecida.

Agradeço a Profa. Dra. Ada Maria de Barcelos Alves, Prof. Dra. Simone Moraes da Costa, e a todos os alunos do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais (LABIFIV), pela parceria e aprendizados desenvolvidos na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Agradeço a Profa. Dra. Maria Christina Werneck Avellar e suas alunas Carla Pereira e Rafaella Paiva, pela colaboração e aprendizados desenvolvidos na UNIFESP.

Agradeço a todos os docentes do departamento de Biofísica de Farmacologia, setor Farmacologia, Prof. Dr. André Sampaio Pupo, Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior e Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi e Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim, que contribuíram para minha formação profissional.

Agradeço a todos os funcionários do departamento de Biofísica e Farmacologia, Giovana, Ana Cristina Murcia de Souza, Paulo Cesar Mioni, Luís de Oliveira, e ao Prof. Hélio Kushima, por todos os ensinamentos e ajuda durante todo esse período de desenvolvimento do meu mestrado.

Agradeço ao Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

Agradeço aos professores que fizeram parte da minha banca de mestrado, contribuindo com discussões científicas e orientações, enriquecendo significativamente meu trabalho acadêmico.

Agradeço as agências de fomento, CAPES e FAPESP, pelo apoio da bolsa e auxílio financeiro prestados durante todo o desenvolvimento do projeto.

“A ciência é mais que um corpo de conhecimento,
é uma forma de pensar, uma forma cética de
interrogar o universo, com pleno conhecimento da
falibilidade humana.”

- *Carl Sagan.*

RESUMO

Os Arbovírus formam um grupo de vírus taxonomicamente diverso. Do ponto de vista epidemiológico e clínico, o vírus da dengue (DENV), o Zika (ZIKV) e o Chikungunya (CHKV), transmitidos pelo mosquito *Aedes spp.*, são considerados os arbovírus de maior relevância, pois estima-se que cerca de 3,9 bilhões de pessoas, vivendo em 120 países, estão susceptíveis a infecções por pelo menos um deles. O DENV e ZIKV codificam a proteína não estrutural 1 (NS1), que possui papel fundamental nas manifestações clínicas dessas infecções virais, além de ser um potencial marcador para o diagnóstico de infecção aguda precoce. Estudos em células endoteliais e macrófagos em cultura demonstraram que a NS1 da DENV atua como agonista do receptor *Toll-like 4* (TLR4), induzindo a secreção de citocinas, o que contribui para a gravidade da dengue. Nesse contexto, sabe-se que infecções virais podem causar inflamações no epidídimo, um órgão do sistema reprodutor masculino fundamental para a maturação dos espermatozoides e fertilidade masculina. Estudos utilizando o modelo experimental de epididimite murino demonstraram que o ZIKV coloniza e se multiplica no epidídimo, causando um quadro inflamatório conhecido como epididimite. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da infecção por DENV no sistema reprodutor masculino. No presente estudo investigamos se as isoformas de NS1-ZIKV e NS1-DENV desencadeiam resposta inflamatória no epidídimo de camundongos, e se essa resposta é mediada pela ativação do TLR4. Utilizamos o modelo experimental de epididimite *ex vivo*, no qual as regiões proximal (segmento inicial) e distal (cauda do epidídimo) de camundongos C57BL/6 machos (90-120 dias) foram isoladas e incubadas por 3 h (34°C e 5%/95% de CO₂/ar) com salina estéril (controle negativo), LPS ultrapuro de *E. coli* (50 ng/ml, controle positivo), NS1-DENV e NS1-ZIKV [1, 10 e 20 µg/ml]. Após as incubações, os tecidos e meio de cultura organotípica foram coletados e processados para ensaios de RT-qPCR e Multiplex, para avaliação da expressão de mediadores inflamatórios (*Il6*, *Il1b*, *Tnf*, *Il10*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl2* e *Cx3cl1*), elementos da via de sinalização TLR (*Tlr4*, *Cd14*, *Myd88*, *Trif* e *Tlr3*), enzimas envolvidas na resposta inflamatória (*Ptgs1*, *Ptgs2* e *Ido1*) e genes envolvidos na função do epidídimo (*Gja1*, *Cdh1*, *Cldn1*, *Cldn3* e *Cldn8*). O desafio inflamatório mediado por NS1-ZIKV e NS1-DENV regulou positivamente a expressão relativa de transcritos que codificam citocinas pró e anti-inflamatórias (*Il1b*, *Il10*, *Ifnb1* e *Ifng*), quimiocinas (*Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5* e *Cxcl2*), enzimas e adesão celular (*Ptgs2*, *Icam1* e *Vcam1*) no segmento inicial e na cauda do epidídimo. A pré-incubação do segmento inicial e cauda do epidídimo com CLI-095 (3 µM), um inibidor da via TLR4, demonstrou que as regiões proximais e distais do epidídimo respondem diferencialmente à inflamação induzida pelas isoformas de NS1 dos flavivírus ZIKV e DENV, sendo parcialmente dependente da via TLR4 na cauda do epidídimo. Ambas as proteínas NS1 promovem regulação da expressão de genes envolvidos na inflamação aguda do epidídimo, sendo possivelmente essenciais para o reconhecimento do ZIKV e DENV pelo epidídimo. Afim de determinar se a infecção por DENV induz resposta inflamatória no epidídimo, investigamos se a infecção com DENV-2 cepa NGC por via intracerebral em camundongos machos Balb/c (8 semanas, dose referente a carga viral de 40 x LD₅₀) ou meio 199 (controle negativo) induz expressão de mediadores inflamatórios. Os animais foram eutanasiados após 4, 5 e 7 dias da infecção, seus epidídimos coletados, segmentados em 4 diferentes regiões (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo) e processados para ensaios de RT-qPCR. Os resultados demonstraram aumento dos níveis de citocinas (*Tnf*) e interferons (*Infg* e *Ifnb1*) nas diferentes regiões do epidídimo de camundongos. Portanto, o desafio de infecção de DENV-2 intracerebral, demonstrou que o vírus DENV é capaz de mediar a regulação gênica e no aumento das moléculas envolvidas na inflamação aguda do epidídimo. Em conclusão, nossos resultados demonstram que a NS1 atua como um padrão molecular associado à infecção por ZIKV e DENV no epidídimo, participando da resposta do órgão contra essas infecções virais. O presente estudo amplia o entendimento da fisiopatologia epididimite viral e suas implicações na fertilidade.

ABSTRACT

Arboviruses form a taxonomically diverse group of viruses. From an epidemiological and clinical point of view, the dengue (DENV), Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHKV) viruses, transmitted by the *Aedes spp.* mosquito, are considered to be the most relevant arbovirus, as it is estimated that around 3.9 billion people living in 120 countries are susceptible to infection by at least one of them. DENV and ZIKV encode the non-structural protein 1 (NS1), which plays a fundamental role in the clinical manifestations of these viral infections, as well as being a potential marker for the diagnosis of early acute infection. Studies on endothelial cells and macrophages in culture have shown that DENV NS1 acts as a Toll-like receptor 4 (TLR4) agonist, inducing the secretion of cytokines, which contributes to the severity of dengue. In this context, it is known that viral infections can cause inflammation in the epididymis, an organ of the male reproductive system that is fundamental for sperm maturation and male fertility. Studies using the experimental murine epididymitis model have shown that ZIKV colonizes and multiplies in the epididymis, causing an inflammatory condition known as epididymitis. However, little is known about the effects of DENV infection on the male reproductive system. In the present study, we investigated whether the NS1-ZIKV and NS1-DENV isoforms trigger an inflammatory response in the epididymis of mice, and whether this response is mediated by TLR4 activation. We used the experimental model of ex vivo epididymitis, in which the proximal (initial segment) and distal (cauda epididymis) regions of male C57BL/6 mice (90-120 days) were isolated and incubated for 3 h (34°C and 5%/95% CO₂/air) with sterile saline (negative control), ultrapure LPS from *E. coli* (50 ng/ml, positive control), NS1-DENV and NS1-ZIKV [1, 10 and 20 µg/ml]. After the incubations, the tissues and organotypic culture medium were collected and processed for RT-qPCR and Multiplex assays to assess the expression of inflammatory mediators (*Il6*, *Il1b*, *Tnf*, *Il10*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl2* and *Cx3cl1*), elements of the TLR signaling pathway (*Tlr4*, *Cd14*, *Myd88*, *Trif* and *Tlr3*), enzymes involved in the inflammatory response (*Ptgs1*, *Ptgs2*, and *Ido1*) and genes involved in epididymis function (*Gja1*, *Cdh1*, *Cldn1*, *Cldn3*, and *Cldn8*). The inflammatory challenge mediated by NS1-ZIKV and NS1-DENV positively regulated the relative expression of transcripts encoding pro- and anti-inflammatory cytokines (*Il1b*, *Il10*, *Ifnb1* and *Ifng*), chemokines (*Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5* and *Cxcl2*), enzymes and cell adhesion (*Ptgs2*, *Icam1* and *Vcam1*) in the initial segment and cauda epididymis. Pre-incubation of the initial segment and cauda epididymis with CLI-095 (3 µM), an inhibitor of the TLR4 pathway, demonstrated that the proximal and distal regions of the epididymis respond differentially to inflammation induced by the NS1 isoforms of the ZIKV and DENV flaviviruses, being partially dependent on the TLR4 pathway in the cauda epididymis. Both NS1 proteins regulate the expression of genes involved in acute epididymal inflammation, and are possibly essential for the recognition of ZIKV and DENV by the epididymis. In order to determine whether DENV infection induces an inflammatory response in the epididymis, we investigated whether intracerebral infection with DENV-2 strain NGC in male Balb/c mice (8 weeks old, viral load dose of 40 x LD₅₀) or medium 199 (negative control) induces the expression of inflammatory mediators. The animals were euthanized 4, 5 and 7 days after infection, their epididymidis collected, segmented into 4 different regions (initial segment, caput, corpus and cauda epididymis) and processed for RT-qPCR assays. The results showed increased levels of cytokines (*Tnf*) and interferons (*Ifng* and *Ifnb1*) in the different regions of the mouse epididymis. Therefore, the intracerebral DENV-2 infection challenge demonstrated that the DENV virus is able to mediate gene regulation and the increase of molecules involved in acute epididymal inflammation. In conclusion, our results demonstrate that NS1 acts as a molecular pattern associated with ZIKV and DENV infection in the epididymis, participating in the organ's response against these viral infections. This study broadens our understanding of the pathophysiology of viral epididymitis and its implications for fertility.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DENV: Vírus da Dengue

CHKV: Vírus Chikungunya

WNV: Vírus do Nilo Ocidental

JEV: Vírus de Encefalite Japonesa

YF: Vírus da Febre Amarela

ZIKV: Vírus Zika

TNF: Fator de necrose tumoral alfa

IL's: Interleucinas

CCL's: Quimiocinas CC's

CXCL's: Quimiocinas CXC's

ssRNA: RNA de fita simples

ORF: do inglês "*Open Reading Frame*"

NS's: Proteínas não-estruturais

ADE: do inglês "*antibody-dependent enhancement*"

mNS1: NS1 de membrana celular

sNS1: NS1 extracelular

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

siRNA: do inglês "*small interfering RNA*"

STAT's: do inglês "*signal transducers and activator of transcription*"

IFN's: Interferons

IFNAR: Receptor interferon alfa/beta

JAK's: Janus quinase

TYK's: Tirosina quinase

PRR's: Receptores de reconhecimento de padrões

TLR's: do inglês "*Toll-like receptors*"

PAMP's: Padrões moleculares associados à patógenos

CD4⁺: Linfócitos T auxiliares

CD8⁺: Linfócitos T citotóxicos

DHT: Diidrotestosterona

AR: Receptores de androgênios

BEB: do inglês “*blood-epididymis barrier*”

CLDNs: Claudinas

OCLDNs: Ocludinas

JAM: Moléculas de adesão juncional

CDH1: e-caderina

CDH3: p-caderina

ZOs/TJPs: Zônulas de oclusão

LPS: Lipopolissacarídeo

MYD88: do inglês “*myeloid differentiation primary response 88*”

TRIF: do inglês “TIR domain – containing adaptor inducing interferon beta”

IRF3: Fator transcricional regulador de interferon 3

NGC: Cepa Nova Guiné neuro adaptado

PBMC: do inglês “*Peripheral Blood Mononuclear Cells*”

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
1.1 Os flavivírus.....	14
1.1.1 O vírus Zika (ZIKV).....	15
1.1.2 O vírus Dengue (DENV)	18
1.1.3 Organização genômica e estrutural do DENV e ZIKV.....	19
1.1.4 Proteína não-estrutural 1 (NS1) – papel nas manifestações clínicas, mecanismos de ação e resposta celular	21
1.2 Impacto das infecções virais em órgãos trato reprodutor masculino	24
1.2.1 O epidídimo – uma visão geral	24
1.2.2 Papeis funcionais da barreira hemato-epididimária.....	28
1.2.3 Outros elementos do sistema imunológico inato no epidídimo.....	31
1.2.4 Inflamação do epidídimo – visão geral e epididimite viral.....	33
2. Objetivos.....	39
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos específicos	39
3. Material e Métodos	41
3.1 Estratégias experimentais.....	41
3.2 Animais utilizados modelo <i>ex vivo</i>	43
3.3 Reagentes para indução de epididimite <i>ex vivo</i>	43
3.4 Epididimite induzida por NS1-DENV e NS1-ZIKV utilizando cultura de órgãos <i>ex vivo</i>	44
3.5 Infecção por DENV2 cepa NGC intracerebral, modelo <i>in vivo</i>	44
3.6 Extração de RNA total	45
3.7 Ensaios de reação de transcriptase reversa (RT) e reação de polimerase em cadeia em tempo real (qPCR).....	45
3.8 Ensaio multiplex de citocinas	48
3.9 Análise Estatística	48
4. Resultados.....	51
4.1 Capítulo 1: Resposta inflamatória do epidídimo de camundongos induzida pelas proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV: papel do receptor TLR4.....	51
4.1.1 <i>NS1-ZIKV e NS1-DENV regulam diferencialmente a expressão relativa das citocinas pró-inflamatórias Tnf e Il6 no segmento inicial e cauda do epidídimo</i>	51
4.1.2 <i>NS1-ZIKV e NS1-DENV regulam positivamente a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória e induzem secreção das quimiocinas CXCL2 e CCL3 no segmento inicial e cauda do epidídimo.</i>	53
4.1.3 <i>NS1-ZIKV e NS1-DENV regulam de forma diferencial a expressão de enzimas envolvidas na resposta inflamatória e moléculas de adesão no segmento inicial e cauda do epidídimo.</i>	56

4.1.4	<i>NS1-ZIKV e NS1-DENV regulam negativamente a expressão de moléculas associadas à integridade de barreira hemato-epididimária no segmento inicial e cauda do epidídimo.</i>	58
4.1.5	<i>CLI-095 preveniu os efeitos pela NS1-ZIKV e NS1-DENV sobre a expressão de mediadores inflamatórios apenas na cauda do epidídimo.</i>	59
4.1.6	<i>NS1-ZIKV e NS1-DENV regulam negativamente a expressão de elementos da via de sinalização do TLR4 no segmento inicial e cauda do epidídimo</i>	61
4.2	Capítulo 2: Perfil de resposta inflamatória do epidídimo de camundongos Balb/c à infecção intracerebral de DENV-2 cepa NGC neuro adaptado	64
4.2.1	<i>A infecção cerebral por DENV2 NGC regula positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias no epidídimo de camundongos</i>	64
5.	Discussão	67
6.	Conclusão	75
7.	Referências Bibliográficas	77
	ANEXO I	106
	ANEXO II	107

Introdução

1. Introdução

1.1 Os flavivírus

Os Arbovírus formam um grupo de vírus taxonomicamente diverso e possuem artrópodes como seus respectivos vetores. Os arbovírus da família *Flaviviridae* englobam aqueles do gênero flavivírus, que consistem em diversos membros distintos, cujo genoma é composto por RNA fita simples (Young, 2018). Cinco flavivírus têm emergido como agentes etiológicos de infecções virais relevantes em humanos, sendo eles o vírus da Dengue (DENV), vírus Nilo Ocidental (WNV), vírus Encefalite Japonesa (JEV), vírus da Febre Amarela (YF), e vírus Zika (ZIKV) (Cavalcante & Tauil, 2016; Daep et al., 2014; Weaver et al., 2016). Em geral, suas infecções podem ser desde assintomáticas, até a progressão nas formas mais graves da doença, como febre hemorrágica e complicações neurológicas.

Com a globalização, houve um aumento da propagação de doenças em indivíduos que não possuem uma imunidade adquirida contra seus agentes etiológicos (Yach, 2005). Esse tipo de ocorrência pode ser observado em diferentes momentos da história global, sendo que uma das primeiras incidências conhecidas deste fenômeno no Novo Mundo foi a introdução da varíola e da sífilis nos nativos americanos durante o período de colonização europeia das Américas, resultando em surtos devastadores e epidemias que causaram um impacto significativo na população nativa (Patterson et al., 2016). Nas últimas décadas, doenças infecciosas emergentes têm sido relatadas com maior frequência em diversos países, incluindo aquelas causadas por flavivírus. O WNV que havia sido isolado anteriormente em 1937 e era predominantemente notificado na África, Ásia, Europa e Austrália, foi relatado pela primeira vez no estado de Nova York, Estados Unidos, em 1999, espalhando-se através da infecção de aves migratórias, cavalos e humano, a tal ponto de se tornar endêmico nas Américas (Enis et al., 2001; Gubler, 2007). Notavelmente, estima-se que cerca de dois quintos de toda população mundial está susceptível a infecção por DENV, sendo que houve um aumento de trinta vezes nos casos da doença nos últimos anos (Chaturvedi & Nagar, 2008). Mais recentemente, em 2016, o ZIKV tem sido considerado uma emergência de saúde global. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 4 milhões de infecções por ZIKV foram registradas apenas no continente americano em 2016 (Baud, 2017).

Uma série de fatores influenciou o ressurgimento de alguns arbovírus, incluindo a sua capacidade de adaptação a novos vetores/hospedeiros, mudanças genéticas do vírus, mudanças climáticas e perturbações de sistemas naturais por ações antropogênicas. Do ponto de vista epidemiológico e clínico, o DENV e ZIKV são considerados os flavivírus de maior relevância, pois estima-se que cerca de 3,9 bilhões de pessoas, vivendo em 120 países, estão susceptíveis a infecções por pelo menos um deles (Figura 1) (Patterson et al., 2016).

Todos possuem o mosquito *Aedes aegypti*, endêmico em todas as regiões do Brasil, como seu principal vetor nas Américas (Coelho et al., 2016). O *Aedes aegypti* é considerado o vetor mais eficaz para a propagação de doenças endêmicas devido a diversos fatores, incluindo a rápida evolução do seu ciclo de vida em proximidade com seus hospedeiros humanos. Esse comportamento estimula de maneira eficiente a disseminação de doenças transmitidas por esses vetores (Wang et al., 2000).

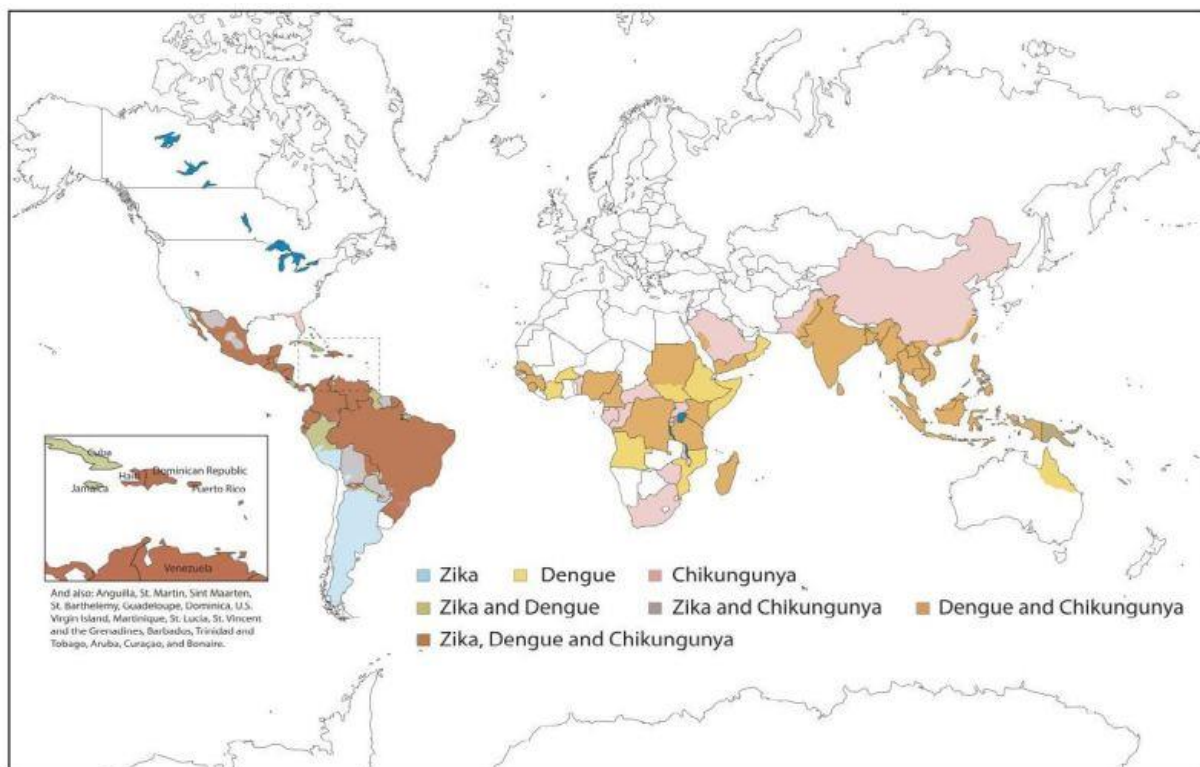


Figura 1. Mapa de representação da distribuição global estimada dos arbovírus causadores da Dengue, Zika e Chikungunya (Patterson et al., 2016).

Considerando a gravidade das infecções causadas pelos flavivírus, juntamente com as altas ocorrências de infecções em todo cenário global, é necessário que sejam realizados mais estudos a fim de mitigar seus efeitos deletérios à saúde dos indivíduos afetados. No presente estudo, direcionamos nossa atenção a fim de analisar as implicações associadas ao DENV e ZIKV devido à sua relevância epidemiológica.

1.1.1 O vírus Zika (ZIKV)

O ZIKV é um vírus emergente que foi isolado pela primeira vez em amostras de macacos *Rhesus* originários da floresta Zika, em Uganda, sendo detectado em humanos pela primeira vez na década de 1950 em diferentes países da África e Ásia (Gubler, 2007). Em 2007, houve

o primeiro grande surto de ZIKV fora da África e Ásia, que ocorreu nas Ilhas Yap (Micronésia), espalhando-se para outras ilhas do pacífico Sul, onde foram registrados 19 mil casos entre 2013 e 2014 (Duffy et al., 2009). No Brasil, o primeiro caso foi detectado em 2015, em Natal-RN, causando um surto epidêmico que atingiu 14 estados do país, e resultou em 440.000-1.300.000 casos suspeitos da doença (Campos et al., 2016; Duffy et al., 2009; Hennessey et al., 2016). Em 2017, mais de 22.000 casos foram confirmados e cerca de 580.000 casos foram considerados suspeitos da doença em 52 países (Pierson & Diamond, 2018).

Uma partícula do ZIKV (Figura 2A) possui 50 nm de diâmetro e é constituído por um invólucro icosaédrico contendo o genoma em seu cerne. Em sua forma madura, o invólucro do ZIKV é composto por 180 cópias de cada uma das proteínas de envelope (E) e de membrana (M), que estão todas inseridas na membrana lipídica via seus domínios transmembranares (Sirohi & Kuhn, 2017). A proteína E é constituída por um par de domínios haste membrana e três ectodomínios que se encontram fora da membrana (DI, DII e DIII) (Figura 2B e C) (Hamel et al., 2015; Shi & Gao, 2017; Sirohi & Kuhn, 2017). A proteína M, ao contrário da proteína E, possui poucos aminoácidos expostos, uma vez que reside sob a proteína E, e obedece a uma organização icosaédrica semelhante (Sirohi & Kuhn, 2017).

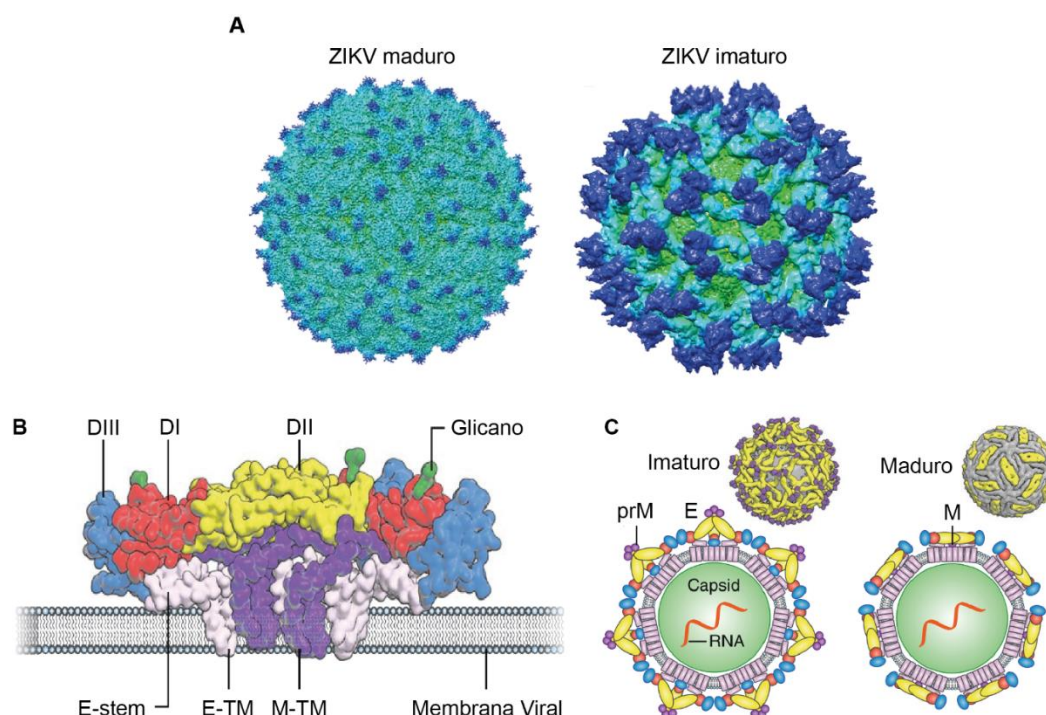


Figura 2: Representação estrutural do ZIKV. **(A)** Representação da forma madura do ZIKV em resolução de 3,8 Å (esquerda) e da forma imatura do ZIKV (direita). **(B)** Representação da proteína E e seus respectivos domínios. A proteína E é uma estrutura alongada de três ectodomínios ligadas à membrana viral por uma haste e dois domínios transmembranares antiparalelos. Os domínios da proteína E estão representados em vermelho, amarelo e azul (domínios I-III, respectivamente); em roxo está representado a proteína M, que também é ligada à membrana viral por dois domínios transmembranares. **(C)** Representação dos arranjos da proteína E em suas formas imatura (esquerda) e madura (direita) (Adaptado de Pierson & Diamond, 2020; Sirohi & Kuhn, 2017).

O período de incubação do ZIKV é de aproximadamente 3 a 12 dias. Embora a maioria dos pacientes não apresente sintomas, cerca de 20-25% apresentam um quadro clínico caracterizado por febre baixa (37,8 a 38,5°C), conjuntivite não purulenta bilateral, cefaleia, mialgia e artralgia com edema periarticular com duração de até uma semana, e em alguns casos pode ocorrer erupção cutânea maculopapular generalizada (Chan et al., 2016). A infecção por ZIKV também pode causar distúrbios neurológicos graves, como a Síndrome de Guillain-Barré e meningite. Em mulheres grávidas, a infecção por ZIKV pode levar a uma condição denominada síndrome congênita da Zika, responsável por gerar malformações congênitas, microcefalia, além de alterações visuais, auditivas e psicomotoras nas crianças (Coyne & Lazear, 2016). Um possível mecanismo associado às anomalias causadas pelo ZIKV no sistema nervoso central envolve o sequestro da maquinaria de autofagia em neurônios e células da glia durante seu processo de replicação viral (Liang et al., 2016).

As síndromes de desenvolvimento fetal são relatadas em 1-13% das crianças nascidas de mães infectadas por ZIKV, sendo que a vulnerabilidade fetal a formas mais graves da doença ocorre principalmente durante o primeiro trimestre de gestação (Brasil et al., 2016; Cauchemez et al., 2016). As lesões cerebrais que ocorrem incluem ventriculomegalia, lisencefalia e calcificações, além de necrose de células neuronais e gliais na transição subcortical, com presença de infiltrados de células T e B na substância branca subcortical (Culjat et al., 2016; Mlakar et al., 2016; Tang et al., 2016). O tropismo celular e tecidual do ZIKV é responsável pela diversidade de sintomas (Miner & Diamond, 2017). Além disso, o ZIKV é capaz de infectar uma ampla variedade de células, incluindo a pele (fibroblastos dérmicos, queratinócitos, células dendríticas), e órgãos do sistema reprodutor masculino, causando outras alterações periféricas, como será abordado posteriormente (Govero et al., 2016; Hamel et al., 2015; Ma et al., 2016).

Embora a transmissão principal da doença ocorra através de mosquitos *Aedes aegypti* infectados, estudos recentes demonstraram que a presença do ZIKV no sêmen é a provável causa da transmissão sexual relatada para a doença. Tal achado contribuiu significativamente para a mudança do paradigma das interações vírus-hospedeiro, modificando sua epidemiologia e os padrões clínicos de infecção (Barzon et al., 2016; Mansuy et al., 2016). A presença do ZIKV foi identificada no sêmen de pacientes com sistema imunológico normal e que se recuperaram em poucos dias da infecção até 141 dias após o início dos sintomas, com a carga viral entre 8,6 a 3,5 log cópias por ml (Mansuy et al., 2016). A persistência de carga viral no sêmen é motivo de grande preocupação no cenário clínico por possivelmente estar associado a um tropismo viral pelas células sexuais masculinas (Foy et al., 2011). Tal observação também confirma a capacidade do ZIKV de infectar órgãos do trato reprodutor masculino, onde pode induzir resposta imunológica severa com repercussões ainda pouco

conhecidas sobre a fertilidade de homens acometidos pelo vírus. Dessa forma, a fim de mitigar os efeitos deletérios de uma infecção por ZIKV, estudos acerca do papel de maturação das partículas virais, do tropismo e dos receptores celulares que estão envolvidos na entrada e colonização do ZIKV nas células, em especial do sistema reprodutor masculino, são cada vez mais necessários.

1.1.2 O vírus Dengue (DENV)

Historicamente, é difícil determinar quando o DENV surgiu pela primeira vez na população humana, pois parte das infecções é assintomática (Mukhopadhyay et al., 2005). Seu registro mais antigo se dá em uma enciclopédia médica chinesa, datada de 992 a.C. (Gubler, 1998). Acredita-se que a doença tenha se espalhado pelos trópicos e subtropicais entre os séculos XIX e XX (Holmes & Twiddy, 2003). No Brasil, o primeiro surto da doença foi registrado no final do século XVII, em Recife-PE e Salvador-BA, levando à óbito cerca de 2.000 pessoas. Desde a década de 1980, o padrão de surtos endêmico-epidêmicos se manteve a cada três a cinco anos no país até 2010, quando passou a ser a cada dois anos (Ministério da Saúde, 2009).

Existem quatro sorotipos associados a doença (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). Quando sintomática, a infecção por DENV pode causar quadros que vão desde febre indiferenciada, dengue clássica e dengue grave, que inclui a febre hemorrágica grave e a síndrome do choque da dengue (Rothman, 2011; Wang et al., 2000). Frente à complexidade de distinção pela classificação tradicional de um paciente com FDH e FD durante a fase aguda de infecção, a OMS em 2009 revisou a classificação devido à presença de uma variedade de sinais e sintomas não específicos da doença. A nova classificação da doença é dividida em dengue sem sinais de alarme, dengue com sinais de alarme e dengue grave (Narvaez et al., 2011). Nas formas mais graves da doença, é caracterizada pelo extravasamento capilar acompanhado de trombocitopenia e homeostasia alterada. Esse quadro clínico também é acompanhado por uma tempestade de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias circulantes, como fator de necrose tumoral alfa (TNF), interleucina 6 (IL6) e quimiocina CC ligante 4 (CCL4) (Rothman, 2011).

Os sintomas mais comuns de DENV se assemelham aos de outras infecções virais, como CHIKV e ZIKV, se manifestando de 5-7 dias após a picada do mosquito infectado. A viremia pode ter início 1 a 5 dias antes dos sintomas, e persistir por até uma semana (Simmons et al., 2012). Parte das infecções é assintomática, sendo influenciada pela idade, sorotipo e

genótipo da DENV, infecções prévias, presença de anticorpos e fatores genéticos. A maioria das infecções resulta em uma recuperação completa do paciente (Reiner et al., 2014).

A infecção por determinado sorotipo da DENV pode conceder uma imunidade duradoura contra este sorotipo, e além de imunidade temporária aos outros três sorotipos. Dessa forma, o mesmo indivíduo pode ser infectado mais de uma vez pelo DENV. As infecções posteriores estão de forma epidemiológica correlacionadas ao aumento do risco de desenvolvimento de formas mais graves da doença, sendo o ADE (aumento da replicação dependente de anticorpo) a explicação para esse aumento de risco de dengue grave em uma infecção secundária (Halstead & O'Rourke, 1977). Neste contexto, é importante ressaltar que o ADE é um fenômeno em que a presença de anticorpos específicos contra o vírus aumenta a entrada do vírus em certas células do sistema imunológico. Isso ocorre quando anticorpos direcionados às proteínas de membrana e envelope se ligam ao vírus, formando complexos imunes que podem ser internalizados pelas células que expressam receptores Fc específicos (Katzelnick et al., 2017). Apesar da via de transmissão mais comum de DENV ser através de picadas por mosquitos, já foram confirmadas outras vias de transmissão como por exemplo, transfusão sanguínea (Tambyah et al., 2008), transplante de tecidos e órgãos (Punzel et al., 2014), exposição percutânea ao sangue de uma pessoa infectada (Chen & Wilson, 2004), e possivelmente amamentação (Barthel et al., 2013). Estudos demonstraram a presença de DENV no sêmen, o que indica sua capacidade de infectar e colonizar o sistema reprodutor masculino (Iannetta et al., 2017; Lalle et al., 2018).

1.1.3 Organização genômica e estrutural do DENV e ZIKV

O DENV e ZIKV são vírus envelopados formados por uma fita simples de RNA (ssRNA) de sentido positivo e tamanho aproximado 10-11 kb. Seus RNAs genômicos contêm uma ORF (do inglês, "*Open Reading Frame*") flanqueada por uma região não codificada no sentido 5'-3'. Após sua introdução na célula hospedeira, a única ORF é traduzida em uma poliproteínas composta por três proteínas consideradas estruturais (proteína C, prM e E) e outras sete proteínas consideradas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 3). Tanto as proteínas estruturais quanto as não-estruturais desempenham papéis importantes na replicação e estrutura do vírus, reconhecimento do receptor celular e processamento de poliproteínas virais (Tijssen, 1985).

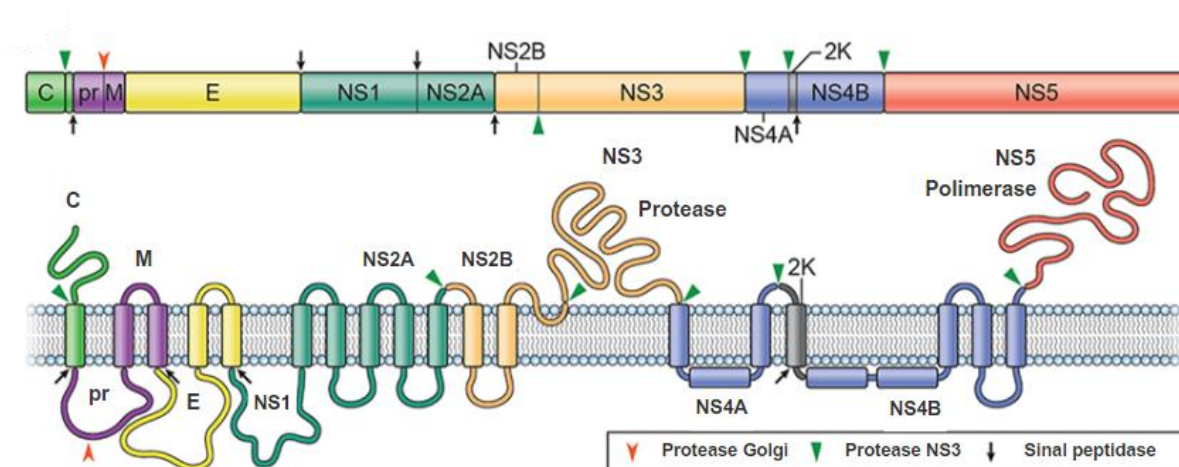


Figura 3. Esquema da organização genômica e estrutural dos flavivírus DENV e ZIKV. O DENV e ZIKV são capazes de codificar uma única ORF que é traduzida no retículo endoplasmático em uma poliproteínas, que será clivada posteriormente por proteases virais da célula hospedeira. O processamento de clivagem irá gerar dez proteínas funcionais, sendo três consideradas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas consideradas não-estruturais (NS's) (Adaptado de Pierson & Diamond, 2020).

A proteína C é conhecida como proteína de capsídeo e se associa ao genoma de RNA (Murray et al., 2008). A prM é uma proteína de pré-membrana, com função de proteger a proteína de envelope de mudanças conformacionais que podem ser induzidas por pH em partículas virais que ainda são imaturas. A proteína E, conhecida como proteína de envelope, possui estrutura composta por três domínios ligados à membrana viral por uma haste helicoidal e dois domínios transmembranares antiparalelos, responsáveis pela interação de ligação do vírus com o receptor celular da célula hospedeira (Wang et al., 1999; Zhang et al., 2017).

Quanto às proteínas não-estruturais, sua maioria desempenha um papel essencial na replicação viral, mas também pode estar envolvida em outras funções. Por exemplo, a NS1 está envolvida em processos de replicação do genoma viral, evasão do sistema imunológico, além de estar envolvida em processos de indução de fortes respostas humorais e celulares no hospedeiro (Akey et al., 2014; Costa et al., 2006). A NS2A faz parte do componente do complexo replicase e também está envolvida nos processos de modulação e evasão do sistema imunológico (Murray et al., 2008). A NS3 é a protease responsável pela clivagem de poliproteínas, sendo uma enzima multifuncional envolvida na replicação viral, tendo como cofatores a NS2B e a NS4A (Bollati et al., 2010). A NS4B faz parte do complexo replicase, além de atuar na modulação e evasão do sistema imunológico (Murray et al., 2008; Zou et al., 2015). Por fim, a NS5 integra o complexo replicase como uma RNA polimerase dependente de RNA para a síntese do genoma viral, e também atua na modulação e evasão do sistema imunológico (Bollati et al., 2010).

1.1.4 Proteína não-estrutural 1 (NS1) – papel nas manifestações clínicas, mecanismos de ação e resposta celular

Dentre as proteínas não-estruturais, destacamos a NS1 devido ao seu papel fundamental para as manifestações clínicas das infecções por DENV e ZIKV, e potencial marcador diagnóstico de infecção aguda precoce. Em infecções por DENV e ZIKV, a NS1 pode ser detectada na corrente sanguínea de indivíduos, circulando em concentrações relativamente altas (até 100 ng/ml) durante as fases agudas de infecção (Alcon et al., 2002; Young et al., 2000). Com massa molecular de 46-55 kDa, dependendo do seu estado de glicosilação, a NS1 existe em múltiplas formas oligoméricas conforme sua localização celular: (1) como um monômero ou dímero de membrana celular (mNS1), estando presente em compartimentos vesiculares citoplasmáticos ou na superfície celular, ou (2) como uma espécie secretada hexamérica solúvel associada a lipídeos (extracelular, sNS1) (Muller & Young, 2013). Estudos indicam que a mNS1 participa da replicação precoce do RNA viral e é encontrada em compartimentos vesiculares induzidos por vírus que abrigam os complexos de replicação viral (Mackenzie et al., 1996). Ambas as formas mNS1 e sNS1 são altamente imunogênicas, sendo associadas à patogenicidade da infecção (Sun et al., 2007). Estudos moleculares têm demonstrado que a NS1 é um fator chave na patogênese dos flavivírus, ativando células do sistema imunológico inato, levando a secreção de citocinas e ruptura da monocamada de células endoteliais, o que contribui para o edema observado em formas mais graves de DENV (Modhiran et al., 2015, 2017). Dessa forma, a proteína NS1 emerge como um elemento central na indução da resposta inflamatória frente a infecção por ZIKV e DENV.

As proteínas NS1 do DENV e ZIKV desempenham um papel importante nos processos de invasão e evasão imunológica, atuando na modulação da maquinaria celular do hospedeiro para que o vírus se propague de maneira eficiente (Lin et al., 2006; Liu et al., 2017). Após internalização do vírus, ocorre a liberação do genoma do RNA viral no citoplasma, permitindo sua replicação. O peptídeo sinal nas proteínas codificadas pelo mRNA viral as guia para o retículo endoplasmático, onde os ribossomos ligados à membrana as traduzem em proteínas estruturais e não estruturais. O polipeptídeo é clivado, e a região C-terminal da proteína E possui um peptídeo sinal que direciona a NS1 do polipeptídeo traduzido para o retículo endoplasmático, onde ocorre a translocação (Falgout et al., 1989). É importante destacar que a região C-terminal da NS1 possui uma sequência octapeptídica (L/MVXSXVXA) essencial para a clivagem, sendo conservada em todos os flavivírus e muito estudada para produção de vacinas baseadas em NS1 (Hori & Lai, 1990). A junção NS1/NS2A também é clivada no retículo endoplasmático por proteases. Apesar de a NS1 não possuir nenhum domínio que atravesse a membrana, sua associação com a membrana plasmática parece ser importante, visto que estudos demonstraram a capacidade de NS1-WNV e NS1-DENV reorganizarem as

membranas dos lipossomas, sugerindo que a interação da NS1 intracelular com outras proteínas virais e células hospedeiras ocorre durante a evolução da patogênese (Akey et al., 2014, 2015; Watterson et al., 2016; Young et al., 2012).

A mNS1, em sua forma dimérica, juntamente com outras proteínas não-estruturais e RNA viral, é direcionada ao retículo endoplasmático, onde forma o complexo de replicação dentro de vesículas específicas. Esse complexo desempenha papel crucial na replicação ativa. A NS1, seja ancorada em glicosilfosfatidilinositol (GPI) ou associada ao colesterol, é recrutada para a membrana plasmática por meio de vias endocíticas ou secretoras, ou se integra à rede trans-Golgi para maturação e subsequente liberação (Muller & Young, 2013). Vale destacar que a forma extracelular sNS1 ancorada em GPI tem sido demonstrada como influenciadora das vias de transdução de sinal, modulando a patogênese dos flavivírus (Robinson, 1997). De maneira geral, DENV e ZIKV manipulam proteínas do hospedeiro para promover a replicação do seu genoma e a tradução do polipeptídeo viral. Essa replicação ocorre em estruturas membranosas induzidas pelo vírus, derivadas do retículo endoplasmático, conhecidas como pacote de vesículas que são formadas pelas proteínas NS1, NS4A e NS4B (Akey et al., 2015; Apte-Sengupta et al., 2014; Welsch et al., 2009).

A mNS1 interage com uma diversidade de proteínas hospedeiras auxiliando na replicação viral, tradução e produção de partículas virais. Dentre suas proteínas parceiras, as proteínas ribossômicas da subunidade ribossômica 60S (RPL18, RPL18a e RPL17) estão envolvidas na tradução, interação com locais internos de entrada ribossômica e ancoragem dos ribossomos à membrana do retículo endoplasmático. Durante o processo de infecção viral, a NS1 interage e realocaliza essas proteínas no local de replicação viral. Esse mecanismo foi elucidado por estudos baseados em siRNA (do inglês "*small interfering RNA*"), que demonstraram uma diminuição da tradução viral, replicação e produção de partículas virais (Cervantes-Salazar et al., 2015).

Do ponto de vista de mecanismo de ação e resposta celular à infecção, estudos recentes demonstraram que os domínios SH2 e SH3 do fator de transcrição STAT3 (do inglês "*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*") interagem com a proteína NS1 de flavivírus, desencadeando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL6, que contribuem significativamente para a patogênese das doenças virais (Chua et al., 2005). Resumidamente, a célula hospedeira responde contra a infecção por flavivírus secretando interferons do tipo I (IFN), incluindo IFNA e IFNB, que possuem propriedades antiproliferativas, antivirais e imunomoduladoras (Haller et al., 2006; Thurmond et al., 2018). Os IFNs secretados se ligam aos receptores de IFN tipo I na superfície das células, formados por duas subunidades, IFNAR1 e IFNAR2, e quinases ativadas por Janus kinase (JAKs), como tirosina quinase 2

(TYK2) e JAK1. Essa ligação resulta na ativação de STATs (Kotenko et al., 2003; Silvennoinen et al., 1993), incluindo STAT3, que interage com a NS1, culminando na secreção de citocinas pró-inflamatórias (Chua et al., 2005). Portanto, a identificação de potenciais receptores que interagem com a NS1 é crucial para entender os mecanismos subjacentes a patogêneses da infecção por flavivírus, incluindo a ZIKV e a DENV.

Diante da complexidade das interações entre os vírus e as células hospedeiras, é fundamental explorar o papel dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores do tipo *Toll* (TLRs). Os TLRs são uma família composta por 13 membros, presentes em células imunológicas ou não, sendo responsáveis pelo reconhecimento de diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) disparando vias de sinalização celular que culminam no recrutamento de mediadores inflamatórios solúveis e celulares, além de outros elementos do sistema imunológico (Takeda & Akira, 2004). Dentre os TLRs, o TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão envolvidos no reconhecimento de ácidos nucleicos virais endossômicos, fornecendo um meio de resposta a uma ampla gama de vírus; enquanto o TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR10 e TLR11 estão presentes na superfície celular e tipicamente interagem com diferentes PAMPs bacterianos, virais e fúngicos. Estudos recentes relataram que a ativação de TLR2 e TLR6 por NS1 durante a infecção por DENV culmina no aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL6 e TNF (Chen et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que a NS1-DENV induz o aumento da expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em macrófagos e células endoteliais humanas e murinas de forma dependente da ativação de TLR4. Desta forma, a interação NS1/TLR4 emerge como um evento que pode contribuir para a resposta do hospedeiro contra infecções por flavivírus e, consequentemente, para a história natural da doença (Modhiran et al., 2015, 2017).

Neste contexto, é importante ressaltar que órgãos do trato urogenital masculino, como testículo e epidídimo, são altamente susceptíveis a eventos inflamatórios, induzidos por infecções sistêmicas ou locais, impactando diretamente em suas funções, e consequentemente na fertilidade masculina (Avellar et al., 2019). A alta incidência de infecções causadas por DENV e ZIKV em diversos países justifica a relevância da realização de estudos mais aprofundados a fim de investigar seu impacto sobre a fertilidade masculina. No presente projeto, focamos no epidídimo devido ao seu papel essencial para a fertilidade masculina, e maior susceptibilidade a lesões inflamatórias causadas por infecções, bacterianas ou virais em comparação ao testículo no cenário clínico (Hedger, 2011). A seguir abordaremos os aspectos básicos sobre a biologia do epidídimo, com ênfase no impacto do processo inflamatório sobre sua função.

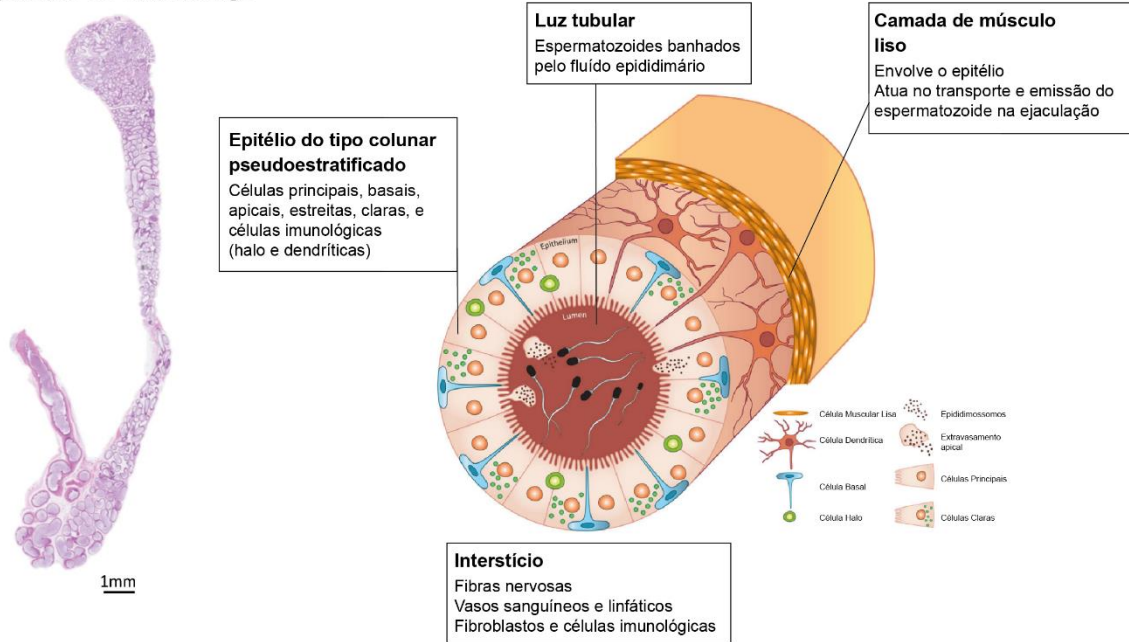
1.2 Impacto das infecções virais em órgãos trato reprodutor masculino

1.2.1 O epidídimo – uma visão geral

Ao deixarem os testículos, os espermatozoides já são morfologicamente diferenciados, porém inaptos para fertilizarem o oócito. Tal habilidade só é adquirida pela passagem do espermatozoide pelo epidídimo, um órgão essencial para a reprodução. Localizado no escroto, o epidídimo está aplicado à margem posterior do testículo, conectando os ductos eferentes ao ducto deferente. Em adultos, o ducto epididimário, quando desenovelado, possui cerca de 6 metros em homens, 3 metros em ratos e 1 metro em camundongos (Robaire & Hinton, 2006). Formado por um único ducto, altamente enovelado, e possui quatro componentes principais: (1) luz tubular, onde encontram-se os espermatozoides, banhados pelo fluido epididimário; (2) epitélio do tipo colunar pseudoestratificado, formado por células principais, células basais, células apicais, células estreitas, células claras e células imunológicas; (3) camada de músculo liso envolvendo o epitélio; e (4) interstício, contendo nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos e células imunológicas e não imunológicas (Figura 4A) (Robaire & Hinton, 2006; Serre & Robaire, 1999).

O epidídimo pode ser dividido em diferentes regiões a partir de critérios anatômicos, morfológicos e funcionais. Em roedores (ratos e camundongos), pode ser dividido em região proximal para região distal, em quatro diferentes regiões, a saber, segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo (Figura 4B). Cada região pode ser subdividida em segmentos separados por septos intersticiais de tecido conjuntivo, sendo de 10 a 19 segmentos no epidídimo de camundongos e ratos, respectivamente (Jelinsky et al., 2007; Turner, 2008). Estudos transcriptômicos revelaram diferenças de expressão de uma série de genes entre os diferentes segmentos epididimários, fazendo com que a expressão de muitos genes apresente um padrão diferencial de acordo com o segmento, ou ainda, seja restrita a alguns deles (Jelinsky et al., 2007; Johnston et al., 2005; Sipilä & Björkgren, 2016). O controle preciso e segmentado da expressão gênica no epidídimo exerce influência sob a atividade secretora e absorviva do epitélio do órgão. Isso resulta na formação de microambientes luminiais distintos entre os diferentes segmentos. Os diferentes microambientes epididimários interagem gradualmente com os espermatozoides, promovendo a maturação e, por fim, levando ao armazenamento em estado quiescente nas porções distais do órgão (Belleannée et al., 2012; Sipilä & Björkgren, 2016). Além da maturação e armazenamento, o epidídimo também promove o transporte dos espermatozoides e sua proteção contra ameaças químicas, metabólicas e patogênicas até o momento da ejaculação. Dessa forma, alterações nas funções do epidídimo estão associadas a quadros de subfertilidade ou infertilidade, isso demonstra a relevância do órgão para a reprodução masculina (Cornwall, 2009).

A Epidídimo de Camundongo



B Camundongo Rato

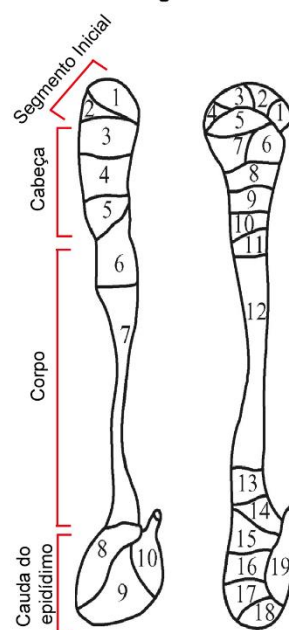


Figura 4. Anatomia do epidídimo de roedores. **(A)** Corte longitudinal histológico de epidídimo de camundongo corado com hematoxilina/eosina (esquerda) e representação dos quatro principais componentes do epidídimo, incluindo os tipos celulares do epitélio epididimário, os compartimentos epitelial, luminal e muscular liso (direita) **(B)** Representação esquemática do epidídimo de camundongo e de rato, indicando as quatro regiões principais do órgão (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo), e os 10 e 19 segmentos epididimários, respectivamente, separados por septos de tecido conjuntivo (Adaptado de Belleannée et al., 2012; Jelinsky et al., 2007; Sullivan & Mieusset, 2016).

O epitélio do epidídimo é composto por uma variedade de tipos celulares, que desempenham papéis essenciais na fisiologia deste órgão. Dentre esses tipos celulares, as células principais e basais estão presentes em abundância em todas as regiões; células

apicais e estreitas, são limitadas ao segmento inicial e à zona intermediária (área de transição entre o segmento inicial e a cabeça no epidídimo de roedores); e as células claras, estão presentes em diferentes regiões, incluindo cabeça, corpo e cauda do epidídimo (Robaire & Hinton, 2006). O epidídimo abriga uma população de células imunológicas, como células dendríticas, macrófagos, linfócitos (células halo), e células basais que estão distribuídas ao longo do órgão em diferentes compartimentos, incluindo o epitelial, intersticial e luminal (Battistone et al., 2019; Pleuger et al., 2020; Robaire & Hinton, 2006).

As células basais epididimárias se estendem ao longo da membrana basal, e de maneira diferenciada entre as regiões do órgão, aumentando significativamente a partir do corpo distal (Shum et al., 2011). Diversos estudos relataram que as células basais do epidídimo são semelhantes aos macrófagos peritubulares em aspectos estruturais e antigênicos (Yeung et al., 1994). Entretanto, estudos mais recentes propuseram que essas células são semelhantes a células epiteliais adjacentes e que são consideradas sensores de regulação da atividade de células principais e células claras (Holschbach, 2002; Shum et al., 2014). As células basais no epidídimo murino possuem extensões citoplasmáticas finas que atravessam a barreira apical das junções estreitas formadas pelas células principais que se unem entre si, alcançando o lúmen epitelial (Shum et al., 2011).

Em relação às células imunológicas, estudos a partir da década passada revelaram uma rede de células dendríticas no epitélio do epidídimo, o que gerou uma mudança de paradigma sobre o papel dessa mucosa como elemento do sistema imunológico inato do órgão (Pierucci-Alves et al., 2018). As células dendríticas são apresentadoras de antígenos, e seu papel fisiológico no epidídimo inclui a regulação de interações complexas entre a tolerância e a ativação imunitária (Pierucci-Alves et al., 2018). Estudos indicaram que as células dendríticas no epidídimo de camundongos formam uma densa rede na área basal do epitélio epididimário, e são altamente ativas no segmento inicial se estendendo através do epitélio até a membrana apical. Além disso, foi relatada uma densa rede previamente não reconhecida de células dendríticas e outros fagócitos mononucleares localizados ao longo epitélio epididimário de camundongos, que realizam, dentre outras funções, a apresentação cruzada de antígenos *in vitro* (Da Silva et al., 2011; Pierucci-Alves et al., 2018; Pleuger et al., 2022; Shum et al., 2014). Os fagócitos mononucleares são considerados protetores do sistema imunológico. São subconjuntos heterogêneos de macrófagos e células dendríticas que possuem como característica capacidade migratória para gradientes de sinais microbianos ou quimiocinas, processamento de fragmentos microbianos e apresentação de antígenos para o sistema imunológico adaptativo, e secreção de moléculas sinalizadoras (Pleuger et al., 2020). Os macrófagos são as células imunocompetentes mais abundantes no epidídimo murino, e estão localizados, além do epitélio, nas regiões intersticiais e peritubulares do epidídimo (Da Silva

& Smith, 2015; Pierucci-Alves et al., 2018; Pleuger et al., 2022). Uma rede de fagócitos mononucleares expressando marcadores de macrófagos e células dendríticas, reveste a base dos túbulos epididimários de camundongos (Da Silva et al., 2011; Pleuger et al., 2020). É importante ressaltar, que assim como as células dendríticas, os macrófagos são eficientes apresentadores de antígenos, podendo inibir respostas à antígenos espermáticos em condições normais, e também podem ativar respostas inflamatórias a patógenos durante uma infecção ativa (Da Silva & Smith, 2015; Pierucci-Alves et al., 2018).

Os linfócitos no epidídimo consistem principalmente de linfócitos T auxiliares (CD4⁺) localizados principalmente no estroma epididimário, linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) localizados dentro do epitélio epididimário e linfócitos B (Pleuger et al., 2020; Yakirevich, 2002). Estudos de caracterização indicaram que o número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ são aproximadamente iguais nas regiões proximal e distal do epidídimo murino, porém, o número de linfócitos B na cauda do epidídimo de camundongos é significativamente maior do que na cabeça (Voisin et al., 2018).

A presença das células imunológicas no órgão sugere um papel significativo do sistema imunológico local na regulação do microambiente epididimário e na proteção contra patógenos invasores. Estudos recentes têm destacado a importância das células imunológicas na manutenção da homeostase epididimária, além de estar envolvidas nos processos de tolerância imunológica, visando a proteção do espermatozoide de ataques autoimunes (Pleuger et al., 2020). A complexidade estrutural e funcional do epidídimo é atribuída à distribuição diferenciada das células epiteliais, juntamente com o perfil de expressão gênica diferenciado entre as diferentes regiões do órgão (Cornwall, 2009; Da Silva et al., 2011; Robaire & Hinton, 2006). Do ponto de vista imunológico, o epidídimo enfrenta dois desafios distintos em suas extremidades proximal e distal. Na extremidade proximal, são necessários mecanismos de tolerância local a fim de evitar ataques autoimunes contra os espermatozoides pós-testiculares (Pierucci-Alves et al., 2018), enquanto na extremidade distal, são necessários mecanismos de defesa imune contra agentes patógenos que ascendem da uretra (Flickinger et al., 1997). O conjunto de populações de células imunes residentes ao longo do epidídimo desempenham um papel no equilíbrio da tolerância imunológica e da defesa do próprio órgão, sendo essenciais para sua homeostasia geral.

Neste contexto, é importante destacar que os mecanismos moleculares, bioquímicos e celulares pelos quais o epidídimo exerce suas funções, ainda são pouco conhecidos e carece de mais estudos. É de alta relevância que os processos epididimários envolvidos na maturação e proteção espermática sejam elucidados, devido ao fato de que metade dos casos de infertilidade masculina apresentam causas desconhecidas, podendo estar associadas a

alterações no processo de maturação e estocagem dos espermatozoides no epidídimo (Cornwall, 2009; Turner, 2008).

As funções epididimárias são reguladas através de uma complexa rede de fatores hormonais, neuronais, testiculares e imunológicos. Hormônios androgênicos, como a testosterona e seu metabólito ativo diidrotestosterona (DHT), são membros da família de esteroides, e são os principais hormônios promotores da diferenciação, morfologia e função epididimária (Hamzeh & Robaire, 2010). Seus efeitos se dão a partir da interação com o receptor de androgênios (AR), membro da superfamília de receptores acoplados a fatores de transcrição, que está expresso em células epiteliais, intersticiais e da musculatura lisa do epidídimo (O'hara et al., 2011; Patrão et al., 2009). Sabe-se que alterações na via de sinalização androgênios/AR, podem afetar a estrutura, desenvolvimento e função do epidídimo, gerando quadros de infertilidade ou subfertilidade (Avellar & Hinton, 2019).

1.2.2 Papeis funcionais da barreira hemato-epididimária

Um componente essencial para a manutenção do microambiente luminal do epidídimo e proteção dos espermatozoides pós-testiculares é a barreira hemato-epididimária (BEB, do inglês "*blood-epididymis barrier*") (Avellar et al., 2019; Hinton & Palladino, 1995; Mital et al., 2011). A BEB é fundamental para a manutenção do privilégio imunológico do epidídimo. Alterações histopatológicas mais comuns que sugerem o comprometimento da BEB incluem lesões inflamatórias, como edema intersticial e presença de infiltrado inflamatório, e/ou granulomas espermáticos (Gregory & Cyr, 2014). Sua integridade, secreção normal e reabsorção pelas células epiteliais de revestimento, desempenham papéis importantes na manutenção e homeostasia do microambiente epididimário.

A BEB é formada por junções estreitas entre as células principais, que dão origem a uma barreira física limitando a passagem de moléculas e células para a luz do ducto. As junções estreitas são compostas por proteínas transmembranares que permitem as células se aderirem umas às outras, e proteínas intracelulares que ligam as proteínas transmembranares ao citoesqueleto celular (Hinton & Howards, 1981; Mital et al, 2011). A barreira fisiológica é formada por transportadores que regulam o movimento de substâncias para dentro ou fora do lúmen, e a barreira imunológica limita o contato pelo sistema imunológico, isolando a maioria das células germinativas e auto antigênicas (Gregory & Cyr, 2014) A interação entre os elementos físicos, fisiológicos e imunológicos da BEB cria uma barreira maximamente competente, protegendo o espermatozoide contra estímulos nocivos de natureza diversa. Vale destacar que a composição da BEB varia ao longo do órgão, sendo

mediada por junções aderentes e junções estreitas, e contatos celulares que envolvem conexões complexas entre diferentes proteínas (Cyr et al., 2007; Dubé et al., 2007) (Figura 5).

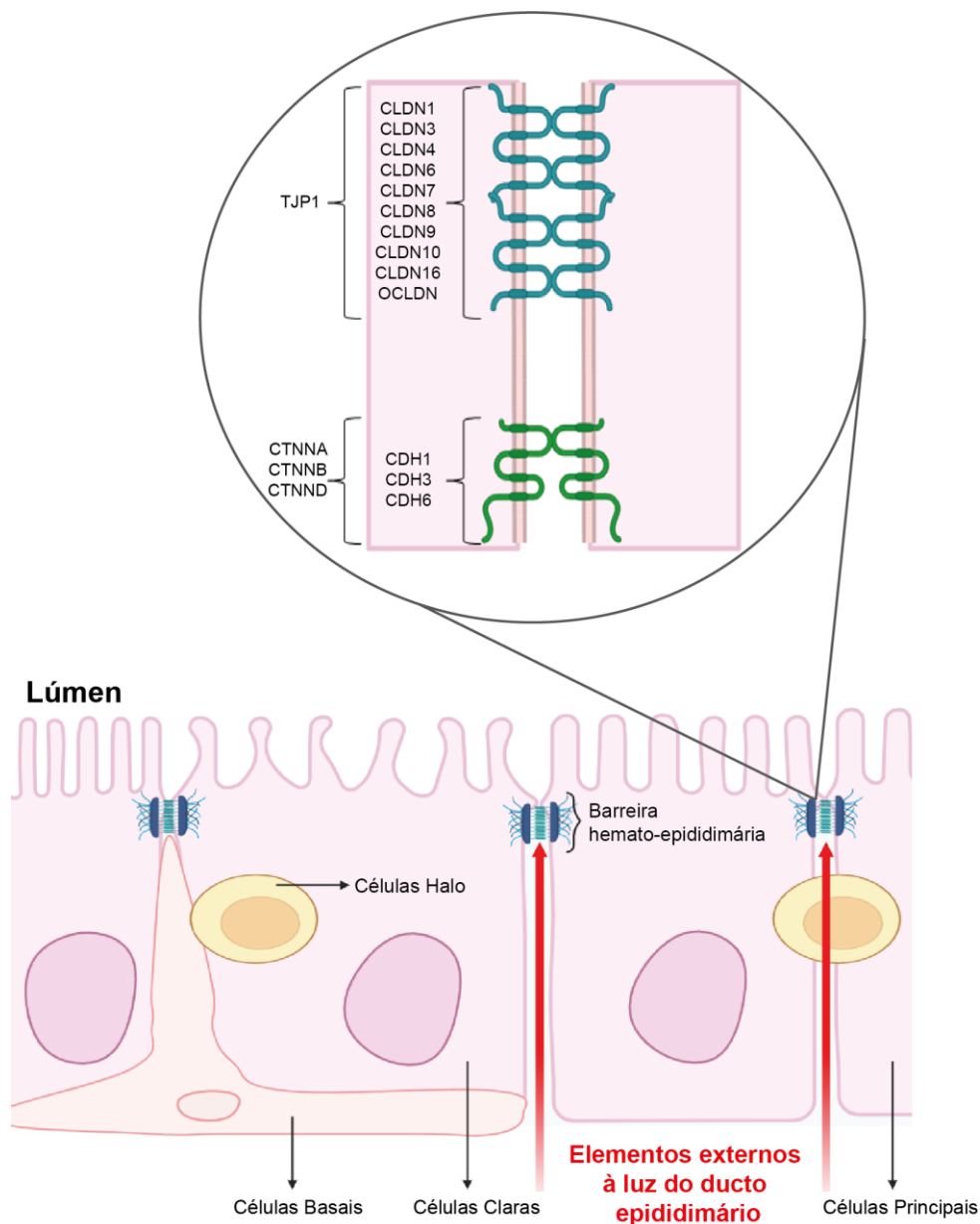


Figura 5. Representação esquemática da composição da barreira hemato-epididimária. A barreira hemato-epididimária (BEB) regula o conteúdo luminal epididimário, limitando o movimento paracelular de íons entre elementos externos à luz do ducto epididimário e o lúmen. Também protege os espermatozoides que estão em processo de maturação e estocagem. A BEB é formada por proteínas de junção estreita transmembrana, denominadas claudinas (CLDNs), bem como a proteína de junção estreita 1 (TJP1), que se liga à cauda citoplasmática das CLDNs e atua como âncora ao citoesqueleto. As caderinas (CDHs) também fazem parte da composição da BEB, assim como vários membros da família de cateninas (CTNNs) que se ligam ao terminal citoplasmático das caderinas, e auxiliam na ligação das caderinas ao citoesqueleto e na transdução de sinal. (Adaptado de Cyr et al., 2007; Gregory & Cyr, 2014).

Existem três principais famílias de proteínas transmembranares localizadas nas junções estreitas da BEB, sendo elas claudinas (CLDNs), ocludinas (OCLDNs) e moléculas de adesão juncional (JAM) (Figura 5). A formação das junções intercelulares inclui interações de moléculas de adesão celular e proteínas juncionais que se agrupam em junções estreitas e comunicantes (Citi, 1993; Mège et al., 2006). As junções aderentes são formadas por caderinas, uma família de moléculas de adesão celular dependentes de cálcio, que medeiam interações dependentes de cálcio entre células adjacentes (Takeichi, 2007). A e-caderina (CDH1) e a p-caderina (CDH3) estão presentes no epidídimo de ratos, sendo diferencialmente expressas no período pós-natal. O transcrito *Cdh3* atingiu níveis máximos no epidídimo de ratos no dia 7 pós-natal, enquanto o *Cdh1*, durante a puberdade, indicando que sua expressão é dependente de androgênios (Cyr et al., 1993). Esses estudos sugerem que à medida em que o epidídimo se desenvolve no período pós-natal, ocorre a transição de uma caderina para outra possibilitando a formação de novos contatos celulares (Cyr et al., 1992, 1993, 2007).

A OCLDN foi a primeira proteína de junção estreita a ser identificada no epidídimo, (Cyr et al., 1999). A OCLDN está localizada na superfície celular apical do epidídimo de camundongos no dia embrionário em que os níveis máximos de androgênios são alcançados, sugerindo que os androgênios possuem um papel importante na regulação das junções estreitas do epidídimo embrionário. Em adultos, as junções estreitas são heterogêneas e a ocludina está localizada apicalmente entre as células principais adjacentes, exceto no segmento inicial (Cyr et al., 1999, 2007).

As CLDNs são proteínas transmembranares ligadas ao citoesqueleto através de proteínas da zônula de oclusão (ZO-1, -2 e -3). Até o momento 20 CLDNs foram identificadas e sua distribuição no epidídimo é ampla e variável, sendo possível observá-las em co-localização com OCLDNs, ou são recrutadas para junções estreitas, sugerindo um papel importante para formação das junções estreitas (Saitou et al., 2000; Van Itallie & Anderson, 2006). No epidídimo de roedores, existem 11 CLDNs (CLDN 1-11) que desempenham diversos papéis na homeostasia do órgão (Cyr et al., 2007). A CLDN1 está localizada nas junções estreitas do epidídimo e em todas as regiões, e sua localização é regulada por androgênios apenas no segmento inicial, indicando que as CLDNs podem ser reguladas de forma diferenciada nas regiões do epidídimo (Gregory et al., 2001). Além de serem necessárias para a função básica da BEB, as CLDNs podem formar poros seletivos de íons na junção estreita, permitindo o transporte paracelular entre células adjacentes. Neste contexto, é importante ressaltar que a seletividade de tais poros depende de CLDNs específicas (Anderson & Van Itallie, 2009). Estudos foram realizados a fim de demonstrar a importância das CLDNs em junções estreitas de epitélios estratificados e simples, para isso utilizaram animais nocaute para *Cldn1*, onde observou-se uma rápida perda de água devido

à falta de uma barreira epitelial intacta, seguido de morte dos camundongos *Cldn1*^{-/-} (Furuse et al., 2002).

As junções estreitas também são compostas de proteínas transmembrana integrais que estão ligadas a proteínas associadas à membrana, como as proteínas de membrana associadas a junção e proteínas de membrana periférica, como por exemplo as proteínas de zônula de oclusão (TJP) (Cyr et al., 2007). No epidídimo de camundongos, a TJP1 está localizada apicalmente entre as células principais adjacentes (Debellefeuille et al., 2003; Levy & Robaire, 1999). Estudos de imunoprecipitação demonstraram que a TJP1 se associa a componentes da junção aderente. Como a TJP1 é uma proteína sinalizadora, é possível que esteja envolvida nas vias de sinalização entre junções aderentes estreitas (Debellefeuille et al., 2003).

1.2.3 Outros elementos do sistema imunológico inato no epidídimo

As relações entre sistema imunológico inato e o trato reprodutor masculino desempenham um papel crucial na fertilidade. Isso se dá ao fato de que diversos microrganismos terem a capacidade de invadir e colonizar os tecidos do trato reprodutor masculino, desencadeando processos inflamatórios que podem resultar em infertilidade temporária ou permanente (Girling & Hedger, 2007). Além dos elementos descritos anteriormente, o epidídimo expressa de forma constitutiva e variável ao longo do órgão outros elementos do sistema imunológico inato, incluindo PRRs e genes antimicrobianos (Browne et al., 2018; Palladino et al., 2007; Rodrigues et al., 2008; Zhao et al., 2008; Zhu et al., 2015). Esses elementos exercem um papel fundamental como primeira barreira de defesa contra uma ampla gama de desafios infecciosos e não infecciosos, e estão envolvidos na regulação de respostas imunológicas inatas e adaptativas.

A imunidade inata antibacteriana e antiviral é mediada por PRRs, que identificam patógenos via ligação aos seus PAMPs. Dentre os PRRs, destacamos os TLRs que estão presentes em células imunológicas (macrófagos e células dendríticas) ou não-imunológicas (células epiteliais, intersticiais e musculatura lisa), que ao reconhecer os PAMPs disparam vias de sinalização celular que culminam no recrutamento de mediadores inflamatórios solúveis e celulares, além de outros elementos do sistema imunológico (Schröder & Bowie, 2005; Takeda & Akira, 2004). É reconhecido que a ativação de TLR's por diferentes PAMPs faz parte dos eventos iniciais de resposta imunológica contra diferentes infecções. Sabe-se que em diferentes tecidos do trato reprodutor masculino de roedores existe uma expressão diferencial de TLR's em células imunológicas e não-imunológicas, estes diferentes tecidos

incluem testículo, epidídimo e próstata (Bhushan et al., 2009; Palladino et al., 2007; Quintar et al., 2006; Rodrigues et al., 2008).

Dentre os integrantes da família de receptores TLR, o TLR4 foi o primeiro membro descoberto por apresentar um papel essencial no reconhecimento e disparo da resposta imunológica contra infecções por bactérias Gram-negativas, via interação com lipopolissacarídeo (LPS), localizado na parede celular destas bactérias (Poltorak et al., 1998). Este reconhecimento requer o envolvimento de proteínas acessórias (Figura 6). Resumidamente, o LPS interage com a proteína de ligação do LPS solúvel, que facilita sua associação ao CD14. Este, por sua vez, atua na facilitação da transferência do LPS ao complexo TLR4/MD2, modelando o reconhecimento do LPS no receptor (Kawai & Akira, 2010; Lu et al., 2008; Park et al., 2009). O TLR4 ao ser ativado gera a dimerização dos domínios extracelulares do receptor, disparando diferentes vias de sinalização intracelular associadas, a depender do tipo de proteína adaptadora recrutada, sendo elas: (a) via dependente da proteína MYD88 (do inglês “*myeloid differentiation primary response 88*”), que faz parte da sinalização canônica, culminando na ativação de fatores de transcrição como NFkB e AP1; e (b) via dependente de TRIF (do inglês “*TIR domain-containing adapter inducing interferon-beta*”), que gera a ativação do fator de transcrição regulado por interferon 3 (IRF3), que irá modular a expressão de genes classicamente envolvidos em respostas antivirais, como os IFN’s (IFNA e IFNB) (Lu et al., 2008).

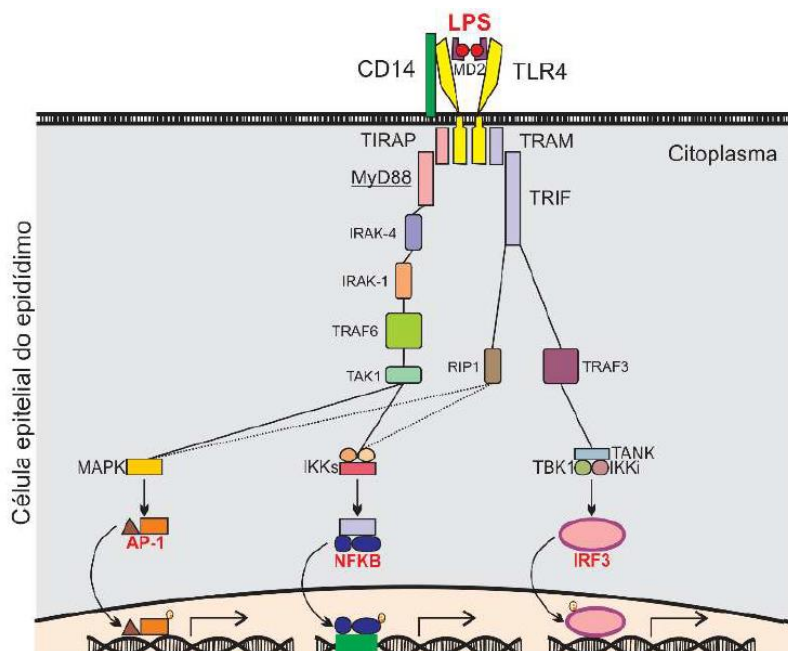


Figura 6: Esquema da via de sinalização mediada por TLR4 ativada por LPS. Nesta representação, é possível observar a visão geral da sinalização celular disparada pelo LPS ao ser associado e reconhecido pelo receptor TLR4 (Adaptado de Lu et al., 2008).

Como apresentado anteriormente, a interação entre epidídimo e sistema imunológico é um aspecto essencial para a fertilidade masculina. Sabe-se que o estabelecimento da tolerância imunológica ocorre antes da geração do gameta maduro, que é considerado um corpo estranho pelo sistema imunológico do indivíduo. Portanto, as células espermáticas são auto antigênicas, capazes de induzir uma resposta autoimune e inflamatória se expostas ao ambiente extraluminal testicular e epididimário (Hedger & Hales, 2006). Porém, na luz nos túbulos seminíferos e do ducto epididimário, os espermatozoides são tolerados durante a espermatogênese e maturação epididimária, evitando que ocorram ataques imunológicos contra essas células (Hedger, 2011). Desequilíbrios entre eventos pró e anti-inflamatórios no epidídimo são capazes de comprometer a função epididimária, implicando em consequências na fertilidade masculina. Embora uma parcela significativa dos casos de infertilidade masculina seja atribuída a causas inflamatórias ou imunológicas, os mecanismos celulares e moleculares que estão envolvidos na resposta do epidídimo frente a inflamação, ainda permanecem pouco conhecidos (Avellar et al., 2019; Hedger, 2011). Sendo assim, é fundamental ressaltar que doenças inflamatórias do epidídimo possuem uma alta prevalência na população masculina em todas as idades, e é um dos principais fatores etiológicos de infertilidade (Nicholson et al., 2010; Pilatz et al., 2015).

1.2.4 Inflamação do epidídimo – visão geral e epididimite viral

A inflamação é uma reação biológica do tecido vascularizado contra estímulos prejudiciais de natureza diversa. Esta resposta tecidual envolve a produção e o recrutamento de diversos mediadores humorais e celulares, atuando de maneira ordenada a fim de combater o estímulo danoso, e restaurar a homeostasia tecidual. No âmbito específico da saúde masculina, a inflamação do epidídimo, conhecida como epididimite, desempenha um papel relevante na redução do bem-estar e produtividade de homens de diversas faixas etárias (Pilatz et al., 2015). Embora seja relatada desde a infância até a senilidade, a epididimite é o quinto diagnóstico urológico mais comum em homens com idades entre 18 e 50 anos (Collyns et al., 1998). Estudos epidemiológicos indicam que a incidência anual de epididimite é de cerca de 250/650 casos a cada 100.000 homens no Reino Unido, sendo a mais frequente condição inflamatória que acomete o sistema reprodutor masculino (Nicholson et al., 2010). Fatores de risco associados à epididimite incluem antecedentes de infecções do trato urinário, infecções sexualmente transmissíveis, anomalias anatômicas, e cirurgias na próstata, no trato urinário ou outros traumas escrotais (Mcconaghy & Panchal, 2016; Taylor, 2015). As infecções bacterianas desempenham um papel preponderante na etiologia da doença, sendo *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e

Staphylococcus aureus as bactérias mais frequentemente envolvidos nos processos inflamatórios (Pilatz et al., 2015).

As lesões nos tecidos resultantes da epididimite abrangem edema, destruição do epitélio, fibrose intersticial e obstrução do ducto, podendo acarretar em mudanças duradouras nos parâmetros espermáticos (McConaghy & Panchal, 2016; Nickel et al., 2002; Pilatz et al., 2015b; Tracy et al., 2008). Do ponto de vista molecular, a regulação da expressão de vários genes ligados à resposta imunológica, tanto inata quanto adaptativa, ocorre de maneira diferenciada, dependendo do tipo de estímulo inflamatório e da região do epidídimo afetada (Pleuger et al., 2020). As alterações morfológicas e funcionais do epidídimo induzidas pela epididimite podem gerar quadros de infertilidade ou subfertilidade temporária ou permanente (Michel et al., 2016). Cerca de 40% dos pacientes diagnosticados com epididimite bacteriana apresentam alterações persistentes nos parâmetros espermáticos, como oligospermia (baixa quantidade de espermatozoides no sêmen) ou azoospermia (ausência de espermatozoides no sêmen), mesmo após realização do tratamento adequado com uso de antibióticos e anti-inflamatórios (Eickhoff et al., 1999; Rusz et al., 2012). Além disso, cerca de 20% dos pacientes evoluem para quadros de epididimite recorrente ou crônica, associados a quadros de dor escrotal intensa, podendo levar a remoção cirúrgica do órgão (Nickel et al., 2002).

Embora as infecções bacterianas sejam o principal fator etiológico da epididimite, avanços nos métodos de diagnóstico molecular têm facilitado a identificação de infecções virais como uma causa relevante desta condição (Browne et al., 2018; Pleuger et al., 2020). É importante ressaltar que aspectos bioquímicos e moleculares relacionados à fisiopatologia da epididimite viral ainda permanece pouco compreendidos. Portanto, é de suma importância aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de defesa do epidídimo contra infecções virais, visando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a prevenção e o tratamento de possíveis sequelas na fertilidade masculina.

Diversas famílias de vírus demonstraram um forte tropismo pelo sistema reprodutor masculino, especialmente os testículos, com cerca de 30 espécies distintas podendo afetar a qualidade espermática (Figura 7) (Dejucq & Jégou, 2001; Salam & Horby, 2017; Zheng et al., 2018). Adicionalmente, alguns destes vírus têm o potencial de prejudicar a fertilidade e ser transmitido por via sexual (Gimenes et al., 2014). Porém, o conhecimento acerca das vias de infecção de diversos vírus no sistema reprodutor masculino ainda é limitado. De maneira geral, as infecções virais atingem os testículos através da corrente sanguínea, causando danos nocivos diretos no órgão ou de maneira indireta via citocinas pró-inflamatórias (Bhushan et al., 2008; Guazzone et al., 2009). No entanto, existem vias alternativas para a disseminação hematogênica, contornando a capacidade imunológica do testículo e do epidídimo,

contribuindo para a disseminação viral no sistema reprodutivo (Houzet et al., 2018; Tsetsarkin et al., 2018; Voisin et al., 2019). Estudos para compreender a translocação viral entre epidídimo e testículos foram conduzidos utilizando clones virais do ZIKV manipulados por microRNA em camundongos, e demonstraram que o ZIKV infecta o testículo por meio da circulação sanguínea, enquanto a infecção do epidídimo ocorre por duas vias distintas: via sanguínea/linfática e via testicular eferente (Tsetsarkin et al., 2018). Embora relatórios clínicos tenham identificado a presença de RNA viral no sêmen, ainda pouco se sabe como ocorre essa passagem do sangue para o sêmen e como ZIKV persistem nos testículos. O mecanismo parece envolver diferentes tipos celulares, incluindo células do próprio sistema imunológico para fazer o transporte do ZIKV aos respectivos órgãos (Joguet et al., 2017; Murray et al., 2017).

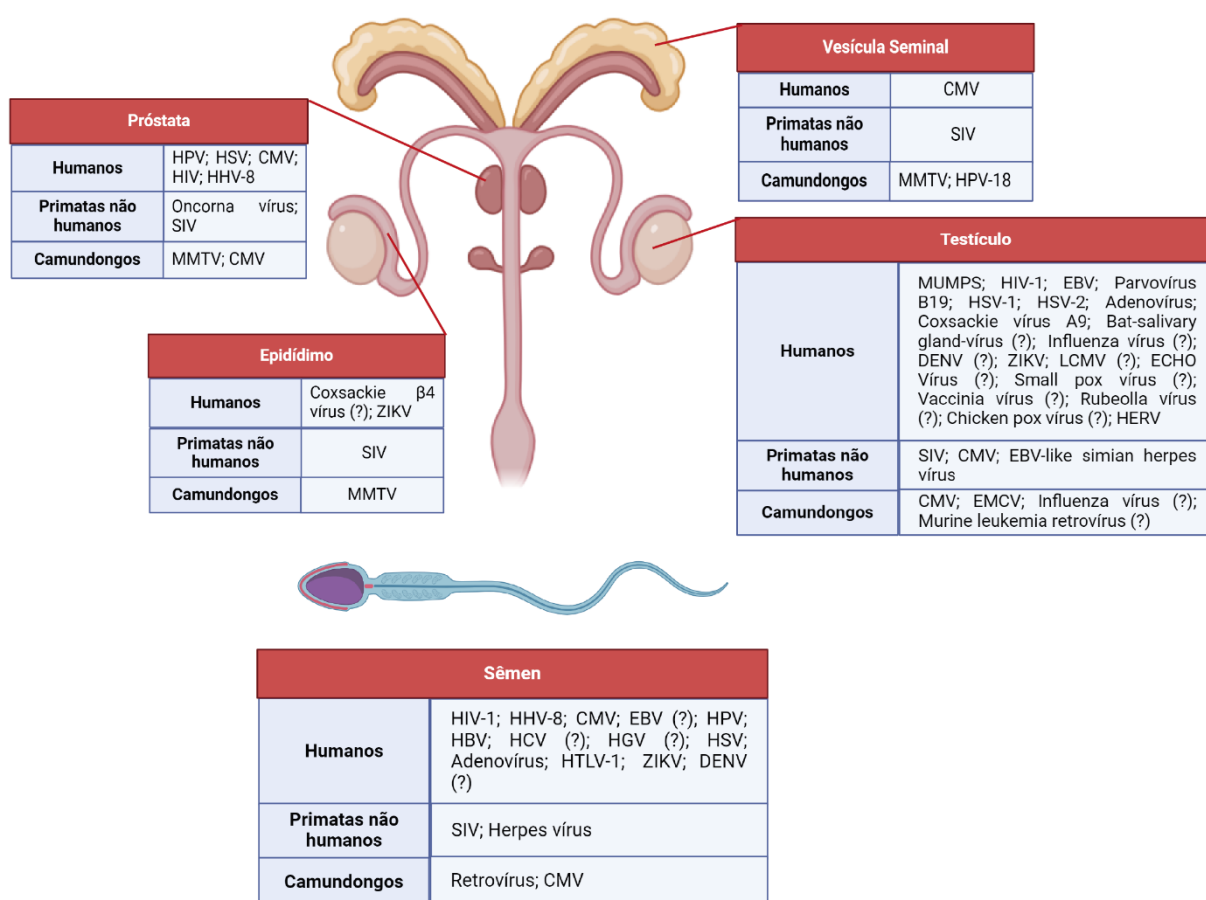


Figura 7. Resumo dos diferentes vírus encontrados em órgãos do sistema reprodutor masculino e sêmen de mamíferos. Os vírus que se encontram com uma interrogação à sua frente, são os que carecem de mais estudos de caracterização de mecanismos de infecção e implicações do vírus no órgão (Adaptado de Dejuq & Jégou, 2001).

Além das implicações para a saúde pública decorrentes da alta infecciosidade e propagação de vírus, há uma crescente preocupação sobre o quanto órgãos do sistema reprodutor são afetados frente às infecções virais. Isso se dá devido ao fato de que infecções

virais podem resultar em quadro de subfertilidade ou infertilidade masculina, provenientes de deficiências de sinalização nas células testiculares, agravadas por mediadores pró-inflamatórios, culminando em hipogonadismo clínico ou subclínico. Além disso, existe um risco potencial de transmissão para gerações subsequentes por meio da incorporação do genoma viral nas células germinativas ou nos genomas embrionários (Dejucq & Jégou, 2001; Gimenes et al., 2014).

A recente epidemia causada por ZIKV revelou descobertas significativas sobre seus efeitos no sistema reprodutor masculino. Essas descobertas foram especialmente relevantes devido à capacidade do ZIKV se replicar no testículo e no epidídimo, resultando em inflamação severa nesses órgãos (Browne et al., 2018; Govero et al., 2016; Ma et al., 2017; Shen et al., 2021). Estudos utilizando como modelo experimental camundongos AG6, nos quais o ZIKV foi injetado via intraplantar em camundongos duplo nocaute para receptores interferon-1 (IFN1) e interferon-2 (IFN2) indicaram que o vírus coloniza o testículo e o epidídimo, causando lesões inflamatórias testiculares e epididimárias severas (Browne et al., 2018; Govero et al., 2016; Ma et al., 2017; Sheng et al., 2021; Uraki et al., 2017). No epidídimo, as alterações morfológicas observadas incluíram redução e desarranjo do epitélio, aumento do diâmetro tubular e infiltrado inflamatório intersticial e luminal (Ma et al., 2017; Sheng et al., 2021). Essas mudanças morfológicas foram acompanhadas de perda da integridade da barreira hemato-epididimária e da função absorviva e secretora do epitélio epididimário, juntamente com o aumento na expressão de citocinas e quimiocinas, como TNF, IL6, IFN α , IFN β , IL18 e CXCL10 (Sheng et al., 2021). Por outro lado, os mecanismos envolvidos na detecção do ZIKV pelo epidídimo e no disparo da resposta inflamatória contra essa infecção, ainda permanecem desconhecidos.

Por outro lado, pouco se sabe sobre o impacto das infecções por DENV no sistema reprodutor masculino. Recentemente, foi relatada a transmissão sexual de DENV em um paciente masculino que retornou de Cuba e Porto Rico para a Espanha. Este paciente desenvolveu sintomas de dengue no momento de chegada, 7 a 10 dias após ter relações sexuais desprotegidas com um parceiro do sexo masculino, que também desenvolveu DENV (European Centre for Disease Prevention and Control., 2019). Um estudo longitudinal prospectivo, realizado com dez pacientes do sexo masculino com sintomas clínicos de infecção aguda de DENV-2, identificou a presença do vírus no sêmen, sendo associada à diminuição de parâmetros espermáticos 30 dias após o início dos sintomas, mesmo sem diferenças significativas nos níveis hormonais (Mons et al., 2022). Estas descobertas enfatizam a necessidade de mais estudos acerca dos impactos da infecção por DENV no sistema reprodutor masculino, pois os impactos da infecção nos órgãos como o epidídimo e testículo, e suas implicações na fertilidade ainda permanecem desconhecidos. A recente

epidemia de DENV no Brasil em 2024 acende um novo alerta para que ocorram mais estudos a respeito das implicações da doença no trato reprodutor masculino. O aprofundamento na fisiopatologia na epididimite viral é fundamental para a elaboração de novas estratégias terapêuticas, com o objetivo de reverter seus efeitos prejudiciais e preservar a fertilidade e bem-estar masculino.

Portanto, considerando (i) o envolvimento da NS1 na patogenicidade das infecções por flavivírus, (ii) o disparo de respostas imunológicas inatas decorrentes da interação NS1/TLR4, (iii) a funcionalidade do TLR4 e sua importância para respostas inflamatórias agudas no epidídimo, e (iv) o quadro de epididimite induzido pela infecção por ZIKV e suas consequências para o sistema reprodutor masculino, buscamos entender se e a NS1-ZIKV e a NS1-DENV estão envolvidas no reconhecimento desses flavivírus e disparo da resposta inflamatória no epidídimo via ativação TLR4.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar se a proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus da Dengue (DENV) e o vírus Zika (ZIKV) desencadeiam resposta inflamatória no epidídimo de camundongos via ativação *Toll-like 4* (TLR4).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se as proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV modulam a expressão de genes e secreção de proteínas envolvidos em processos de resposta inflamatória (*Il6*, *Tnf*, *Il1b*, *Il10*, *Ifnb1*, *Ifng*, *Ptgs1*, *Ptgs2*) e quimiocinas relacionadas ao recrutamento de células imunológicas (*Cx3cl1*, *Cxcl2*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4* e *Ccl5*) no epidídimo de camundongos;

- Avaliar se o estímulo inflamatório induzido pelas proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV é dependente da ativação de TLR4 no epidídimo de camundongos;

- Avaliar se o estímulo inflamatório induzido pelas proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV altera a expressão de genes envolvidos na homeostase e integridade de barreira hemato-epididimária (*Idol1*, *Gja1*, *Icam1*, *Vcam1*, *Cdh1*, *Cldn1*, *Cldn3* e *Cldn8*);

- Avaliar se a infecção por DENV-2 modula a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória (*Tnf*, *Ifnb1* e *Ifng*) no epidídimo de camundongos.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Estratégias experimentais

De forma sucinta, na primeira parte do projeto adotamos o modelo experimental *ex vivo* em cultura organotípica como estratégia para abordar os objetivos delineados no projeto. Esse tipo de modelo nos permite cultivar as regiões do epidídimo em um ambiente controlado, fornecendo nutrientes necessários para sua sobrevivência e funcionalidade. Entre as vantagens desse método, destacamos a capacidade de observar os processos fisiológicos dos tecidos em um contexto isolado, sem a interferência direta de outros sistemas do organismo vivo. Essa abordagem é fundamental para a caracterização detalhada dos mecanismos teciduais que foram investigados no presente trabalho. Realizamos os seguintes experimentos:

- (i) Ensaios de RT-qPCR e ensaio Multiplex em duas regiões do epidídimo de camundongos, região proximal (segmento inicial) e distal (cauda do epidídimo), que foram submetidos à indução de epididimite com as isoformas de proteína NS1-ZIKV e NS1-DENV, com objetivo de caracterizar o perfil de expressão de genes e secreção de proteínas envolvidas no processo inflamatório (citocinas, quimiocinas e interferons), função e integridade de barreira hemato-epididimária, e via TLR;
- (ii) Ensaios de RT-qPCR em duas regiões do epidídimo de camundongos, região proximal (segmento inicial) e distal (cauda do epidídimo), submetidos ao pré-tratamento com inibidor de via TLR4 CLI-095, com objetivo de caracterizar se o perfil de expressão inflamatório disparado pelas NS1-ZIKV e NS1-DENV está sendo mediado via TLR4;

Na segunda parte do projeto, avaliamos a capacidade do DENV-2 em induzir epididimite. Para tal, adotamos o método de inoculação intracerebral para infecção por DENV-2 cepa NGC neuroadaptado, que é um modelo animal amplamente empregado em estudos de eficácia de protótipos vacinais, no qual a proteção contra a infecção, em geral, é medida pela ocorrência ou não de letalidade em camundongos infectados. Foram realizados os seguintes experimentos:

- (i) Ensaios de RT-qPCR nas quatro regiões do epidídimo de camundongos (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo) submetidos à infecção de DENV-2 cepa Nova Guiné (NGC) por injeção intracerebral, com objetivo de investigar se a DENV-2 NGC é capaz de gerar modificações no perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias e interferons no epidídimo.

Para representar de forma clara as análises realizadas, um esquema de delineamento experimental é representado na figura 8:

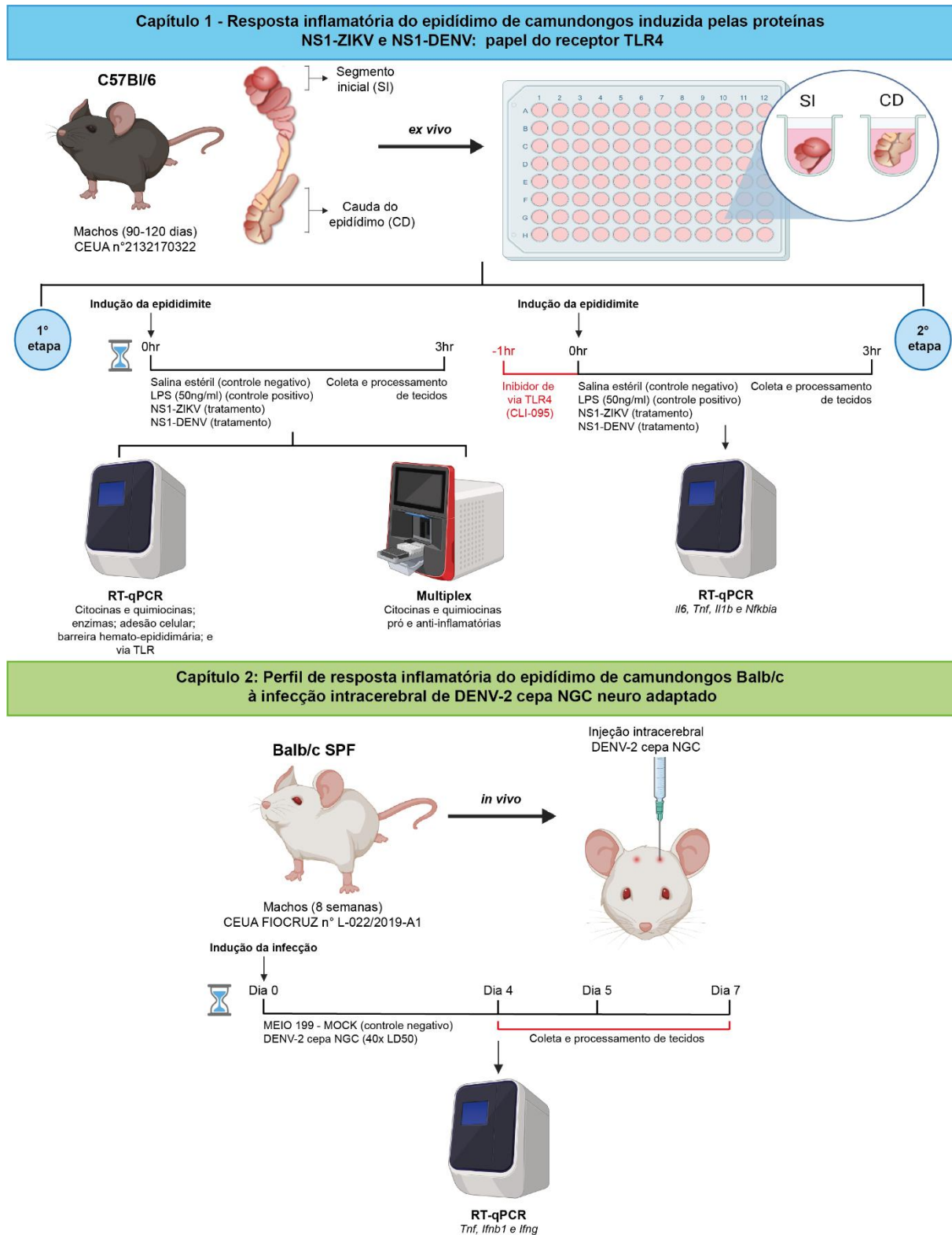


Figura 8. Representação esquemática do delineamento experimental do projeto.

3.2 Animais utilizados modelo *ex vivo*

Utilizamos camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem C57Bl/6, com 90-120 dias de idade, selvagens, adquiridos de fonte comercial (Centro de Pesquisa e Produção de Animais – CPPA – UNESP Botucatu). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia do IBB/UNESP sob luz controlada (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura (22 a 24°C), com livre acesso à água e ração padrão para roedores. Realizamos todos os procedimentos de acordo com as diretrizes para cuidados com animais e uso de animais de laboratório, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP, processo nº2132170322 (Anexo I).

Os animais foram eutanasiados por overdose de isoflurano por via inalatória, seguido de deslocamento cervical para confirmação da morte do animal. Em seguida os epidídimos do camundongo foram coletados, e segmentados em duas diferentes regiões: proximal (segmento inicial) e distal (cauda do epidídimo). As diferentes regiões foram submetidas à indução de epididimite modelo *ex vivo*.

3.3 Reagentes para indução de epididimite *ex vivo*

Para indução do modelo experimental de epididimite *ex vivo*, utilizamos a NS1 recombinante de DENV-2 (NS1-DENV) e ZIKV (NS1-ZIKV), gentilmente doadas pela Dra. Napak Modhiran, Centro Australiano para Pesquisa sobre Doenças Infecciosas, Escola de Química e Biociências Moleculares, Universidade de Queensland, Austrália. Resumidamente, a NS1 recombinante foi expressa em células de *Drosophila* S2 estavelmente transfectadas. A proteína foi purificada por afinidade a partir do meio de cultura utilizando uma coluna acoplada ao anticorpo monoclonal anti-NS1. O complexo de transfecção foi lavado após 4 horas. O meio foi colhido no dia 2 após a transfecção e concentrado utilizando uma coluna de centrifugação de 100-kD (Millipore). As preparações recombinantes de NS1 foram testadas quanto à contaminação por LPS através do ensaio LAL, utilizando o kit de quantificação de endotoxinas cromogênicas LAL (Pierce, Cat. A39552), tendo-se verificado que não continham endotoxinas (leituras de fundo representando <0,1 EU/ml ou <10pg de endotoxina/ml equivalente foram encontradas para o NS1-DENV e NS1-ZIKV purificada a 40 mg/ml e para os estoques de trabalho de preparações de NS1 transientemente expressas e concentradas). As imunodepleções de NS1 foram efetuadas utilizando anticorpos monoclonais de camundongo anti-NS1 e anticorpos de controle anti-E, purificados a partir de ascite e ligados a Dynabeads Protein G Beads (Life Technologies Cat. 10003D) (Modhiran et al., 2015, 2017). Também foi utilizado LPS ultrapuro de *E. coli* 055:B55 como controle positivo de inflamação (Invivogen, Cat. Tlrl-pb5lps).

3.4 Epididimite induzida por NS1-DENV e NS1-ZIKV utilizando cultura de órgãos *ex vivo*

O segmento inicial e a cauda do epidídimo foram isoladas e incubadas *ex vivo* com salina estéril (controle negativo), LPS ultrapuro de *E. coli* (controle positivo), NS1-DENV e NS1-ZIKV de acordo com o protocolo descrito por Michel et. al. 2016, com algumas modificações (Andrade et al., 2024). Após a eutanásia, o epidídimo foi dissecado em gelo para isolamento do segmento inicial e cauda do epidídimo. As regiões do órgão foram rapidamente transferidas para uma placa de 96 poços, com fundo redondo contendo meio DMEM/F12 sem soro (Gibco, Cat. 11320033), suplementado com 1% de Antibiótico-Antimicótico (Gibco, Cat. 15240062), e incubados a 34°C e 5%/95% de CO₂/ar. Após 30 min de estabilização, transferimos as regiões de órgão para um meio de cultura fresco contendo LPS ultrapuro de *E.coli* 055:B55 (50ng/ml; N= 8/região do epidídimo) (Invivogen, Cat. Tlr-pb5lps), NS1-DENV (1, 10 ou 20 µg/ml; N= 4-5/região do epidídimo), ou NS1-ZIKV (1, 10 ou 20 µg/ml; N= 4/região do epidídimo) durante 3 h. As regiões epididimárias contralaterais foram manipuladas em paralelo, mas incubadas na ausência dos respectivos tratamentos. Após a incubação, as regiões epididimárias foram lavadas em tampão PBS, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até serem utilizadas. Os meios de cultura organotípica também foram coletados após o tempo de tratamento indicado, e armazenado a -80°C.

Adicionalmente, segmento inicial e cauda de epidídimo de outro lote de animais foram coletados e pré-tratados com o inibidor de via TLR4 CLI-095 (Invivogen, Cat. tlrcli95) por 1 h antes da indução de epididimite. Realizamos a padronização da concentração de CLI-095 utilizando (0.3, 1 e 3 µM; N= 3/região do epidídimo) (Matsunaga et al., 2011; Wei et al., 2016), e foi estabelecida a concentração que inibe significativamente a ativação da via TLR4 no epidídimo de camundongo após tratamento com LPS (Figura Suplementar S1 e Tabela Suplementar S2). Após 3 h, os tecidos foram lavados em tampão PBS, congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até serem utilizados.

3.5 Infecção por DENV2 cepa NGC intracerebral, modelo *in vivo*

Para o modelo *in vivo* de infecção por DENV-2, os experimentos foram conduzidos em parceria com o Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais, que possui como chefe a Prof. Dra. Ada Maria de Barcelos Alves, pesquisadora titular do Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ L-022/2019-A1 (Anexo II).

Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo descrito por (Amorim et al., 2019), com algumas modificações. Camundongos BALB/c SPF, machos (8 semanas de idade; N= 2/região do epidídimo), foram anestesiados com quetamina/xilazina e inoculados por via intracerebral com 30 µl de uma suspensão viral DENV-2 Nova Guiné C (NGC) neuro adaptado a camundongos correspondente à 40x a dose letal de 50% dos animais (40 x LD₅₀). Como controle, 2 camundongos foram inoculados com 30 µl de meio 199 (Sigma, Cat. M453) pela via intracerebral. Após 4, 5 e 7 dias de infecção, os animais foram eutanasiados por overdose de isofluorano via intramuscular, seguido de deslocamento cervical para confirmação da morte do animal. Em seguida o sangue foi coletado por punção cardíaca, e os epidídimos do camundongo foram coletados, e divididos em quatro diferentes regiões (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo). Rapidamente após dissecação e segmentação, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido, e armazenados a -80°C até serem utilizados.

3.6 Extração de RNA total

O RNA total das regiões do epidídimo foi extraído com o reagente TRIzol® (Life Technologies, Cat. 15596026) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, homogeneizamos as amostras com o reagente TRIzol® com auxílio do homogeneizador Polytron (PT 1300 D, Kinematica). Após centrifugação (12000 x g, 10 min, 4°C), adicionamos clorofórmio e homogeneizamos as amostras em vórtex. Após 5 min de incubação e nova centrifugação (12000 x g, 15 min, 4°C), coletamos a fase aquosa superior contendo o RNA total, seguido de precipitação com isopropanol e lavado com etanol 75% (v/v). O RNA total foi ressuspenso em 10-20 µl de água livre de nucleases tratada com DEPC. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro para determinação da concentração de RNA e seu grau de pureza através da relação A260/A80. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% SYBR™ Safe (Invitrogen, Cat. S33102), tampão TBE 1x e corrida de 40 min a 100V (0,6-0,7 Amp), utilizando 1 µg de RNA. A integridade de RNA foi determinada por observação das bandas correspondentes a 28S e 18S (rRNA). Amostras que não apresentaram bandas 18S e 28S íntegras e bem definidas, e relação A260/A280 < 1,8 foram descartadas.

3.7 Ensaios de reação de transcriptase reversa (RT) e reação de polimerase em cadeia em tempo real (qPCR)

Realizamos ensaios de RT-qPCR para avaliação dos transcritos dos genes envolvidos na via de sinalização TLR3 (*Tlr3*), TLR4 (*Tlr4*, *MyD88*, *Cd14*, *Trif* e *Nfkb1a*), resposta inflamatória (*Il6*, *Tnf*, *Il1b*, *Il10*, *Ifnb1*, *Ifng*, *Cx3Cl1*, *CxCl2*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4* e *Ccl5*), enzimas (*Ptgs1*, *Ptgs2* e *Ido1*), moléculas de adesão (*Icam1* e *Vcam1*) e função de barreira hemato-

epididimária (*Gja1*, *Cdh1*, *Cldn1*, *Cldn3* e *Cldn8*), nas diferentes regiões do epidídimo submetidos ao modelo experimental de epididimite.

Para o ensaio de reação de transcriptase reversa, a síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit Luna Script® RT SuperMix (New England BioLabs, Cat. E3010) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente realizamos a mistura de RNA total (1 µg/reação), 5x Luna Script RT SuperMix e água livre de nucleases em volume final de 10 µl, seguido de incubação a 25°C por 2 min, 55°C por 10 min e 95°C por 1 min. Reações na ausência de transcriptase reversa foram realizadas como controle negativo para avaliar possível contaminação genômica das amostras utilizadas.

Os oligonucleotídeos *Hprt1*, *Il6*, *Tnf*, *Il1b*, *Cxcl2*, *Ccl2*, *Nfkb*, *Tlr4*, *Cd14*, *Trif* e *MyD88* já haviam sido padronizados anteriormente por outros membros do laboratório, os demais foram desenhados e padronizados para definição da melhor concentração de uso e sua eficiência (Figuras Suplementar S3 e S4).

Para os ensaios de qPCR seguimos o protocolo descrito anteriormente por Andrade et al. (Andrade et al., 2021). Resumidamente, os ensaios foram realizados em duplicata, como controle negativo consistindo de ausência de cDNA, utilizando o termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems) e kit Luna SYBR Green Master Mix Universal (New England BioLabs, Cat. M3003L). O cDNA (2,5-10 ng/reação dependendo do alvo, Tabela 1) foram amplificados nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C/1 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C (15 s) e anelamento a 60°C (1 min). A análise da curva de dissociação foi efetuada no final de cada reação para controle de qualidade. O *cycle threshold* (Ct) e a eficiência de cada reação foram determinados de acordo com algoritmos do sistema utilizado. A expressão relativa de cada transcrito foi determinada seguindo Pfaffi (2001), utilizando *Hprt1* como controle endógeno.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR

Transcrito	Nº de acesso no NCBI	Sentido	Sequência (5'-3')	Eficiência da Amplificação (%)	Amplicon (bp)
<i>Hprt1</i>	NM_013556.2	+	TCCATTCTATGACTGTAGA	106,5	90
		-	ATCATCTCCACCAATAACTT		
<i>Il6</i>	NM_031168.2	+	CTTAATTACACATGTTCTCTG	99,7	92
		-	CAAGTGCATCATCGTTGTTC		
<i>Tnf</i>	NM_001278601.1	+	CCTATGTCTCAGCCTCTTCTCA	81,9	100
		-	CTTCTCATCCCTTTGGGGAC		
<i>Il1b</i>	NM_008361.4	+	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	99,8	136
		-	ATGTGCTGCTGCGAGATTG		

<i>Il10</i>	NM_010548.2	+	AGGCGCTGTCATCGATTCT	90	104
		-	ATGGCCTTGTAGACACCTTGG		
<i>Ifnb1</i>	NM_010510.2	+	CCAGCTCCAAGAAAGGACGA	91	217
		-	AGTCTCATTCCACCCAGTGC		
<i>Ifng</i>	NM_008337.4	+	GGAGGAACTGGCAAAAGGATG	100	218
		-	GACCTGTGGGTTGTTGACCT		
<i>Cx3Cl1</i>	NM_009142.3	+	CTGCCCTCACTAAAAATGGTGG	88	121
		-	AATGTGGCGGATTCAAGGCTT		
<i>CxCl2</i>	NM_009140.2	+	GCGCCCAGACAGAAGTCATA	100	224
		-	CGAGGCACATCAGGTACGAT		
<i>Ccl2</i>	NM_011333.3	+	CACTCACCTGCTGCTACTCA	85	117
		-	GCTTGGTGACAAAACTACAG		
<i>Ccl3</i>	NM_011337.2	+	CAGCCAGGTGTCATTTTCCTG	82	234
		-	GGCTACTTGGCAGCAAACA		
<i>Ccl4</i>	NM_013652.2	+	CCCAGCTCTGTGCAAACCTA	87	114
		-	CCATTGGTGCTGAGAACCCCT		
<i>Ccl5</i>	NM_013653.3	+	TGCTCCAATCTTGACGTCGT	86	160
		-	GCAAGCAATGACAGGGAAGC		
<i>Ptgs1</i>	NM_008969.4	+	CAACCGTGTGTGTGACCTGCT	84	366
		-	GCAATCTGGCGAGAGAAGGCAT		
<i>Ptgs2</i>	NM_011198.4	+	TGCCCCGACACCTTCAACATT	103	294
		-	CAGCCATTTCTTCTCTCCTGT		
<i>Ido1</i>	NM_008324.3	+	GGGGGTCAAGTGGAGTAGACA	99	174
		-	GCAGATTCTAGCCACAAGGA		
<i>Gja1</i>	NM_010288.3	+	CATTGGGGGAAAGGCGTGA	94	175
		-	CCATGTCTGGGCACCTCTCTTT		
<i>Icam1</i>	NM_010493.3	+	GCCTCCGACTTTCGATCTT	80	269
		-	CTGGTCCGCTAGCTCCAAAA		
<i>Vcam1</i>	NM_011693.3	+	TAAACGCGAAGGTGAGGACG	88	157
		-	GGATCCTTGGGGAAAGAGTAG		
<i>Cdh1</i>	NM_009864.3	+	TCGCCACAGATGATGGTTCAC	99	185
		-	AGTAAAGGGGGACGTGTTGG		
<i>Cldn1</i>	NM_016674.4	+	ACTGTGGATGTCCTGCGTTT	102	258
		-	ACTAATGTGCGCCAGACCTGAA		
<i>Cldn3</i>	NM_009902.4	+	TACAAGACGAGACGGCCAAG	80	261
		-	TGGTGGGTGCATACTTGTCTG		
<i>Cldn8</i>	NM_018778.3	+	ATCCAAGTAGATGCGGGTGG	99	94
		-	TCAGCGTGATGGATTGGCAT		
<i>Tlr4</i>	NM_021297	+	TCTGAGCTTCAACCCCTTG	97,1	92
		-	TGCCATGCCTTGCTCTTCA		
<i>Tlr3</i>	NM_126166.5/ NM_001357316 .1/NM_0013573 17.1	+	TGCGTTGCGAAGTGAAGAAC	85	95
		-	ACCCCGGGGAGAACTCTTTA		
<i>Cd14</i>	NM_009841	+	GACCTGTCTGACAATCCTGAAT	96,2	267
		-	CTGCTTCAGCCCAGTGAAAGA		

<i>MyD88</i>	NM_010851	+	CTGCTACTGCCCCAACGATA	96,9	255
		-	TTCTGTTGGACACCTGGAGAC		
<i>Trif</i>	NM_174989	+	CTCAAGACCCCTACAGCCAG	88,4	194
		-	GCACCTAGAATGCCAAAGGC		
<i>Nfkb1a</i>	NM_010907	+	GCCAGCTGACCCTGGAAAAT	93	102
		-	CATCATAGGGCAGCTCATCC		

3.8 Ensaio multiplex de citocinas

Realizamos ensaio multiplex para avaliação do painel de citocinas e quimiocinas IL1B, IL6, IL10, IFNG, TNF- α , CCL2, CXCL2, CCL3 e CCL4. Meios de cultura organotípica dos respectivos tratamentos realizados durante a etapa de indução de epididimite foram coletados e armazenados à -80°C para ensaio Multiplex de citocinas e quimiocinas. O ensaio foi realizado utilizando o kit Luminex Discovery Assay (R&D System, Cat. LXSAMSM-09) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, diluímos numa proporção de duas vezes (1:2) o meio de cultura organotípica em diluente calibrador RD6-52. Em seguida, incubamos as respectivas amostras com coquetel de micropartículas diluídas por 2 h à temperatura ambiente em agitador orbital horizontal 800 $\pm$ 50 rpm. Utilizando um dispositivo magnético, foram realizados 3 ciclos de lavagem com 100 μ l de tampão de lavagem, seguido de incubação com 50 μ l do coquetel biotina-anticorpo por 1 h em agitador orbital. Após incubação, foram realizados mais 3 ciclos de lavagem, seguido de incubação por 30 min com 50 μ l de estreptavidina-PE em agitador orbital magnético. Mais 3 ciclos de lavagem foram realizados pós-incubação, em seguida as micropartículas foram ressuspensas utilizando 100 μ l de tampão de lavagem, seguida por 2 min de incubação em agitador orbital. A leitura foi realizada no analisador MAGPIX System (MERCK, Sigma-Aldrich). Os dados obtidos foram normalizados para concentração (pg/ μ g) de proteína total quantificada pelo método Bradford.

3.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (SEM). Aplicamos o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados e o teste F ou Brown-Forsythe para avaliar a homoscedasticidade dos dados. As diferenças estatísticas entre mais de dois grupos foram analisadas pela Análise de Variância de Uma Via (One-way ANOVA), seguida do teste post-hoc de Bonferroni e Dunnet. Foram consideradas significativas as diferenças associadas à probabilidade $p < 0,05$. O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do programa GraphPad Prism 10.2 (GraphPad Software).

Resultados

4. Resultados

4.1 Capítulo 1: Resposta inflamatória do epidídimo de camundongos induzida pelas proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV: papel do receptor TLR4

4.1.1 NS1-ZIKV e NS1-DENV regulam diferencialmente a expressão relativa das citocinas pró-inflamatórias *Tnf* e *Il6* no segmento inicial e cauda do epidídimo

Para investigar se as isoformas de proteína NS1-ZIKV e NS1-DENV desencadeiam resposta inflamatória aguda no epidídimo de camundongos, utilizamos o modelo *ex vivo* de epididimite. Para tal, analisamos a expressão relativa dos transcritos *Il6* e o *Tnf*, que são citocinas pró-inflamatórias com papéis cruciais na resposta contra infecções e lesões teciduais, como marcadores da resposta inflamatória no segmento inicial e cauda do epidídimo submetidas à exposição com salina estéril (controle negativo), LPS ultrapuro de *E.coli* (controle positivo), e três diferentes concentrações de proteína NS1-ZIKV e NS1-DENV (1, 10 e 20 µg/ml) (Modhiran et al., 2015).

O LPS regulou positivamente os níveis relativos do transcrito *Il6* no segmento inicial e cauda do epidídimo em comparação ao controle salina (>2,9 vezes, $p<0,0001$; >4,6 vezes, $p<0,0001$, respectivamente) (Figura 9 e Tabelas Suplementares S5 e S6). Além disso, o LPS regulou positivamente os níveis relativos do transcrito *Tnf* no segmento inicial e cauda do epidídimo em comparação ao controle salina (>4 vezes, $p=0,0068$; e >2 vezes, $p=0,0025$; respectivamente) (Figura 9 e Tabelas Suplementares S5 e S6).

Não observamos regulação positiva dos níveis relativos do transcrito *Il6* no segmento inicial exposto a NS1-ZIKV e NS1-DENV em todas as concentrações testadas (Figura 9A). Por outro lado, houve regulação positiva dos níveis relativos de *Il6* na cauda do epidídimo exposta a NS1-ZIKV 20 µg/ml (>6,2 vezes, $p<0,0001$) e NS1-DENV 1 (>3 vezes, $p=0,0083$), 10 (>3,6 vezes, $p=0,0026$) e 20 µg/ml (>4,5 vezes, $p=0,0003$), em comparação ao controle salina (Figura 9 e Tabelas Suplementares S5 e S6). Paralelamente, observamos regulação positiva dos níveis relativos do transcrito *Tnf* no segmento inicial exposto a NS1-ZIKV 20 µg/ml (>4,7 vezes, $p=0,0071$) e NS1-DENV 1 µg/ml (>3,8 vezes, $p=0,0250$) 20 µg/ml (>4 vezes, $p=0,0075$) no segmento inicial em comparação ao controle salina (Figura 9 e Tabelas Suplementares S5 e S6). Todas as concentrações testadas de NS1-ZIKV e NS1-DENV regularam positivamente a expressão relativa deste transcrito na cauda do epidídimo (NS1-ZIKV: 1 µg/ml >2,9 vezes, $p=0,0003$; 10 µg/ml >2,9 vezes, $p=0,0004$; e 20 µg/ml >4,5 vezes, $p<0,0001$; NS1-DENV: 1 µg/ml >1,9 vezes, $p=0,0217$; 10 µg/ml >2,7 vezes, $p=0,0003$; e 20 µg/ml >2,7 vezes, $p=0,0004$) (Figura 9 e Tabelas suplementares S5 e S6). Como a maior concentração testada (20 µg/ml) de NS1-ZIKV e NS1-DENV regulou positivamente a

expressão relativa dos transcritos analisados, as próximas análises foram realizadas utilizando apenas esta concentração.

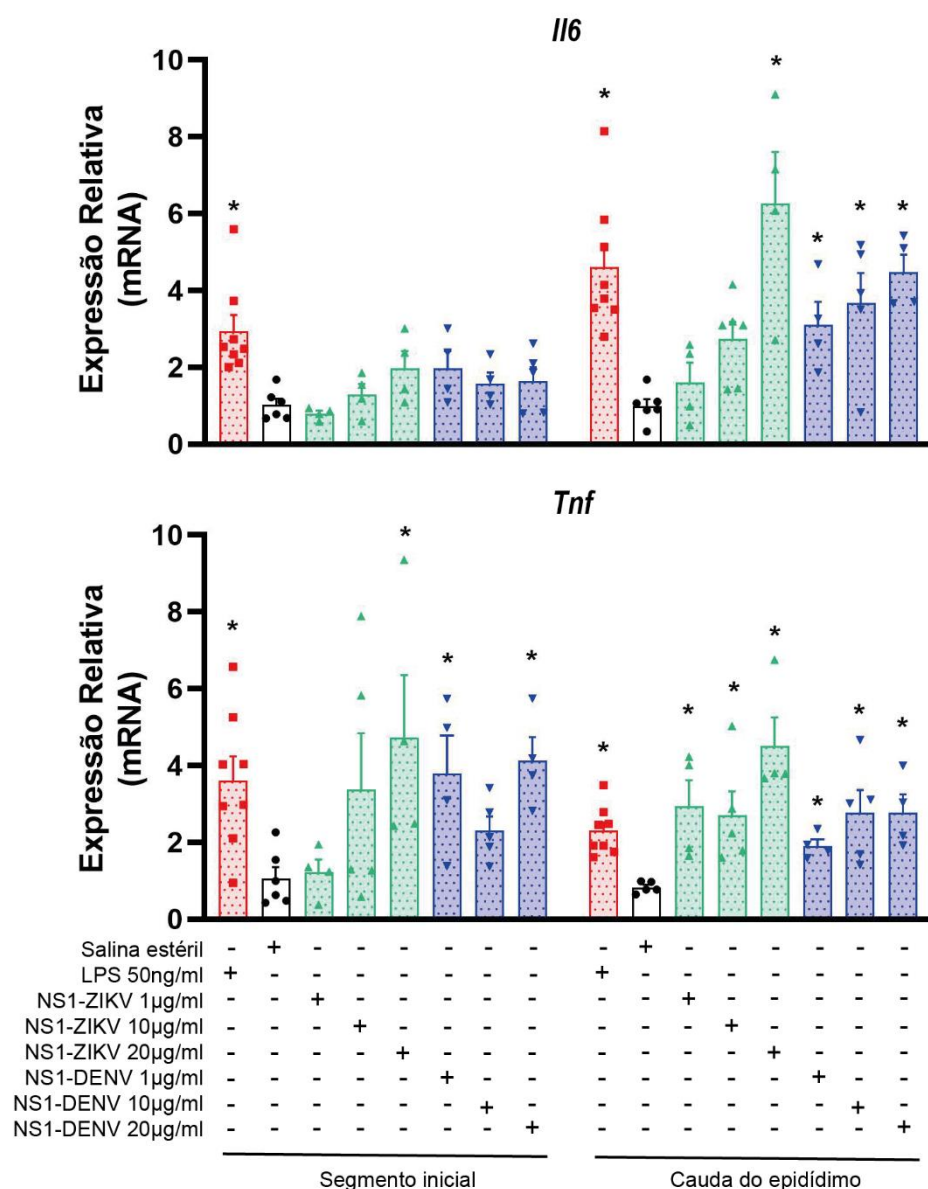


Figura 9. Resposta inflamatória induzida por NS1-ZIKV e NS1-DENV no segmento inicial e cauda do epidídimo de camundongos. Expressão relativa dos transcritos *Il6* e *Tnf* no segmento inicial e cauda do epidídimo de camundongos submetidos a indução de epididimite por 3 h com LPS (50 ng/ml), NS1-ZIKV e NS1-DENV em três diferentes concentrações (1, 10 e 20 µg/ml). O controle negativo (salina estéril) está representado em branco, o controle positivo (LPS) está representado em vermelho, a NS1-ZIKV está representada em verde, e a NS1-DENV está representada em azul. Os valores foram normalizados utilizando o transcrito *Hprt1* como controle endógeno e expressos em relação à quantidade de mRNA determinada no grupo controle salina estéril. Os valores foram expressos como média ± SEM n= 4-8 / grupo. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparado ao controle salina estéril (*p < 0,05; One-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni).

4.1.2 NS1-ZIKV e NS1-DENV regulam positivamente a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória e induzem secreção das quimiocinas CXCL2 e CCL3 no segmento inicial e cauda do epidídimo.

Para caracterizar o perfil de expressão de genes envolvidos na inflamação mediante do estímulo das proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV no segmento inicial e cauda do epidídimo, realizamos ensaios de RT-qPCR para analisar diferentes citocinas, quimiocinas e interferons que desempenham papéis cruciais na resposta inflamatória contra estímulos infecciosos.

O LPS regulou positivamente os níveis relativos dos transcritos *Il1b* (>2,1 vezes, $p<0,0001$), *Il10* (>5,4 vezes, $p=0,0394$), *Ifnb1* (>10,6 vezes, $p=0,0087$), *Ifng* (>14,9 vezes, $p<0,0001$), *Ccl2* (>2,8 vezes, $p<0,0001$), *Ccl3* (>7,3 vezes, $p<0,0001$), *Ccl4* (>6,1 vezes, $p=0,0014$), *Ccl5* (>3,1 vezes, $p=0,0012$) e *Cxcl2* (>5,1 vezes, $p<0,0001$) no segmento inicial (Figura 10 e Tabela Suplementar S7). De forma semelhante, o LPS regulou positivamente os níveis relativos dos transcritos *Il1b* (>3,3 vezes, $p=0,0029$), *Il10* (>6,3 vezes, $p=0,0020$), *Ifnb1* (>19 vezes, $p<0,0001$), *Ifng* (>17,1 vezes, $p<0,0001$), *Ccl2* (>3 vezes, $p=0,0002$), *Ccl3* (>5,5 vezes, $p<0,0001$), *Ccl4* (>5,9 vezes, $p=0,0002$), *Ccl5* (>4,5 vezes, $p<0,0001$) e *Cxcl2* (>10,1 vezes, $p<0,0001$) na cauda do epidídimo (Figura 10 e Tabela Suplementar S7). Entretanto, os níveis relativos do transcrito *Cx3cl1* não foram alterados no segmento inicial frente ao tratamento com LPS; porém, observamos diminuição da expressão relativa deste transcrito na cauda do epidídimo (<1,7 vezes, $p=0,0405$) (Figura 10 e Tabela Suplementar S7).

Por sua vez, a NS1-ZIKV regulou positivamente os níveis relativos dos transcritos *Il1b* (>1,9 vezes, $p=0,0042$), *Il10* (>7 vezes, $p=0,0162$), *Ifng* (>4,4 vezes, $p=0,0033$), *Ccl3* (>5,1 vezes, $p=0,0016$), *Ccl5* (>2,2 vezes, $p=0,0163$) e *Cxcl2* (>2 vezes, $p=0,0250$) no segmento inicial (Figura 10 e Tabela Suplementar S7). Embora o efeito da NS1-ZIKV sobre os níveis relativos do transcrito *Ifnb1* não tenha sido estatisticamente significativa, observamos aumento biológico na sua expressão no segmento inicial (>9,2 vezes, $p=0,0745$) (Figura 10 e Tabela Suplementar S7). A NS1-ZIKV também regulou positivamente os níveis relativos dos transcritos *Il10* (>6,3 vezes, $p=0,0020$), *Ifnb1* (>19 vezes, $p<0,0001$), *Ifng* (>11,1 vezes, $p=0,0002$), *Ccl3* (>5,7 vezes, $p=0,0001$), *Ccl4* (>5,3 vezes, $p=0,0047$), *Ccl5* (>2,7 vezes, $p=0,0126$) e *Cxcl2* (>3,7 vezes, $p=0,0040$) na cauda do epidídimo (Figura 10 e Tabela Suplementar S7).

Já a NS1-DENV regulou positivamente os níveis relativos dos transcritos *Il1b* (>2 vezes, $p=0,0008$), *Ifnb1* (>9,2 vezes, $p=0,0745$), *Ifng* (>3,6 vezes, $p=0,0137$), *Ccl3* (>4,6 vezes, $p=0,0017$) e *Ccl5* (>2,6 vezes, $p=0,0113$) no segmento inicial (Figura 10 e Tabela Suplementar S7). Em paralelo, a NS1-DENV regulou positivamente os níveis relativos dos transcritos *Il1b* (>2,9 vezes, $p=0,0396$), *Il10* (>9,1 vezes, $p<0,0001$), *Ifnb1* (>33 vezes, $p<0,0001$), *Ifng* (>11,1 vezes, $p=0,0001$), *Ccl3* (>6,9 vezes, $p<0,0001$), *Ccl4* (>4 vezes, $p=0,0388$), *Ccl5* (>5,6 vezes,

$p < 0,0001$) e *Cxcl2* (>6,81 vezes, $p < 0,0001$) na cauda do epidídimo (Figura 10 e Tabela Suplementar S7).

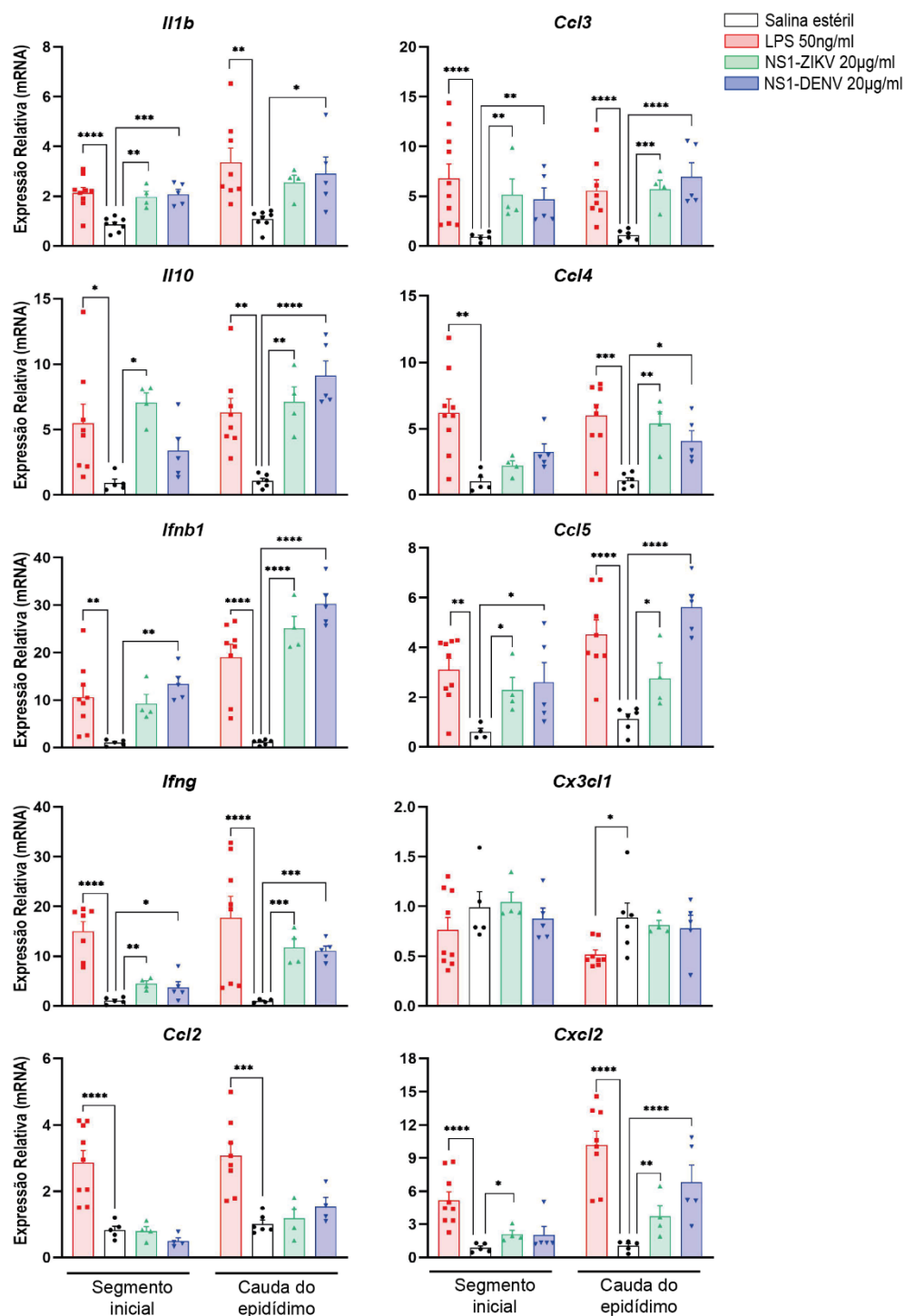


Figura 10. Perfil de expressão de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e interferons) na região proximal (segmento inicial) e na região distal (cauda) do epidídimo de camundongos frente ao estímulo inflamatório durante 3 h por LPS (50 ng/ml), NS1-ZIKV e NS1-DENV (20 µg/ml). Os valores foram normalizados utilizando o transcrito *Hprt1* como controle endógeno e expressos em relação à quantidade de mRNA determinada no grupo controle salina estéril. Os valores foram expressos como média $\pm$ SEM $n = 4-9$ / grupo. Quantidade de asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparado ao controle salina estéril (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$).

O ensaio Multiplex indicou que os efeitos do LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV sobre a secreção de citocinas e quimiocinas para o meio de cultura foram mais brandos do que o observado sobre a expressão relativa dos transcritos. Todos os nove alvos analisados foram detectados em amostras de meio de cultura organotípica provenientes da incubação de segmento inicial e cauda do epidídimo do grupo controle negativo (salina estéril) em valores dentro dos seus respectivos limites de detecção do ensaio (Tabela Suplementar S8). Por sua vez, o LPS induziu aumento da concentração das quimiocinas CXCL2 e CCL3 acima do limite de detecção em três e duas amostras de segmento inicial, e quatro e três amostras de cauda do epidídimo (N=5/região do epidídimo), respectivamente (Figura 11). Esses resultados impossibilitaram a análise estatística, mas indicam que ambas as quimiocinas CXCL2 e CCL3 foram reguladas positivamente pelo LPS no segmento inicial e cauda do epidídimo. Apesar de não ter resultado em diferença estatística, o LPS aumentou a concentração das citocinas IL1B (>1,5 vezes, $p=0,5762$), TNF (>3,6 vezes, $p=0,0806$), IL6 (>2 vezes, $p=0,4952$) e IL10 (>1,6 vezes, $p=0,2885$) e das quimiocinas CCL2 (>2,1 vezes, $p=0,3045$), CCL4 (>2,8 vezes, $p=0,1165$) no segmento inicial (Figura 11 e Tabela Suplementar S8). Por outro lado, não observamos efeito relevante do LPS sobre as concentrações dessas citocinas e quimiocinas na cauda do epidídimo (Figura 11 e Tabela Suplementar S8).

De forma semelhante ao observado para o LPS, a NS1-ZIKV induziu aumento da concentração das quimiocinas CXCL2 e CCL3 acima do limite de detecção em quatro e duas amostras de segmento inicial (N = 4), e em quatro amostras de cauda do epidídimo (N = 4) (Figura 11). Além disso, a NS1-ZIKV induziu aumento da concentração de CCL2 (>2 vezes, $p=0,6436$) e IL10 (>2 vezes, $p=0,4950$) na cauda do epidídimo, embora sem alcançar a significância estatística (Figura 11 e Tabela Suplementar S8). Em paralelo, a NS1-DENV também induziu aumento da concentração das quimiocinas CXCL2 e CCL3 acima do limite de detecção em quatro e duas amostras de segmento inicial (N = 4), e em quatro amostras de cauda do epidídimo (N = 4) (Figura 11). Além disso, a NS1-DENV promoveu aumento da concentração de IL1B (>3 vezes, $p=0,4445$), IL6 (>2 vezes, $p=0,2915$), e IL10 (>4 vezes, $p=0,1639$), CCL2 (>3 vezes, $p=0,3069$), CCL4 (>5 vezes, $p=0,1060$), apesar de não ter alcançado significância estatística para nenhum desses alvos (Figura 11 e Tabela Suplementar S8). Nenhum efeito relevante foi observado para a NS1-ZIKV e NS1-DENV sobre as concentrações dos demais alvos analisados tanto no segmento inicial quanto na cauda do epidídimo (Figura 11 e Tabela Suplementar S8).

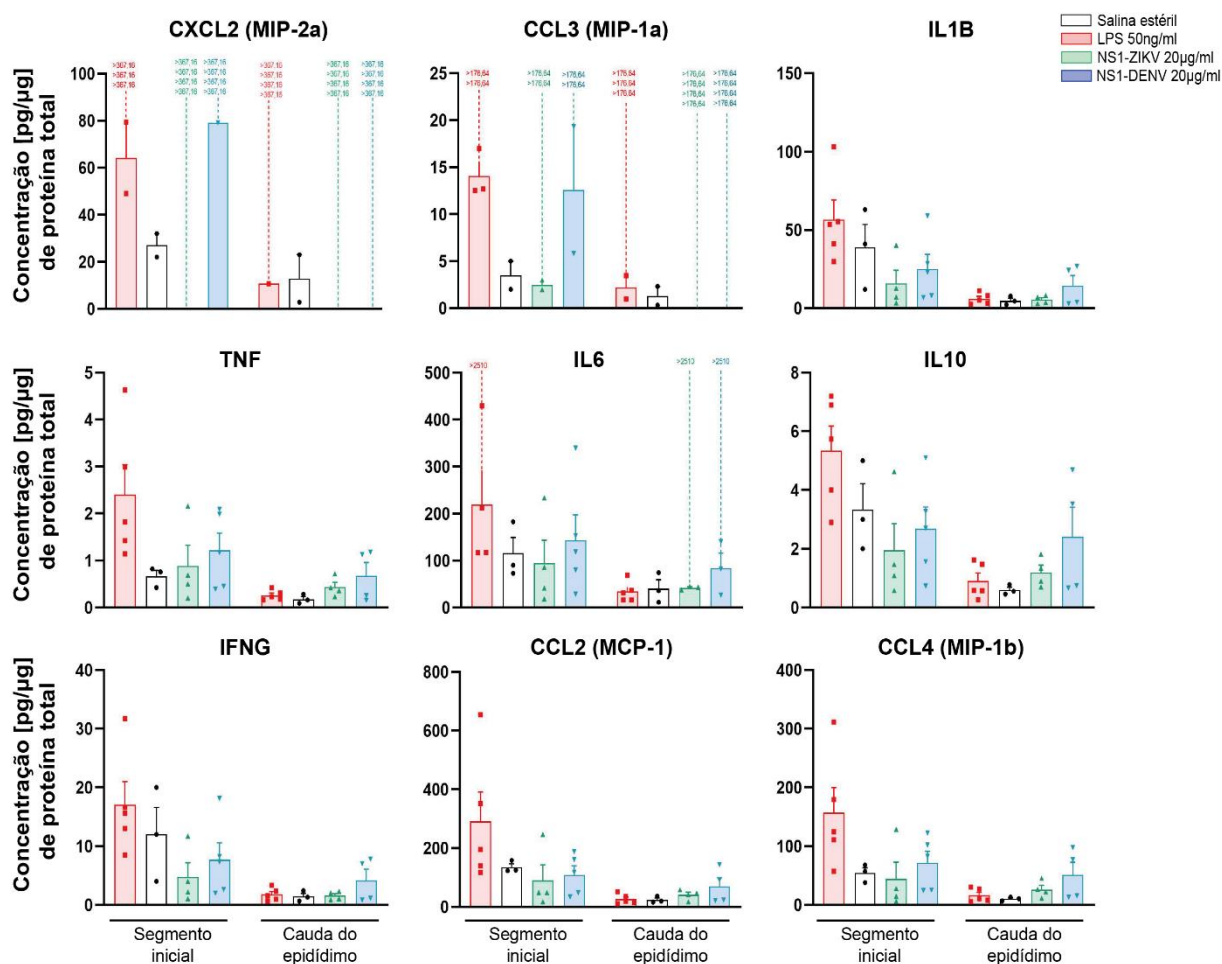


Figura 11. Concentração mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e interferons) secretados em meio de cultura organotípica durante 3 h mediante estímulo de LPS (50 ng/ml), NS1-ZIKV e NS1-DENV (20 μg/ml) no segmento inicial e cauda do epidídimo de camundongos. Os valores foram expressos como média ± SEM n= 3-5 / grupo (One-way ANOVA, seguido de pós teste Dunnet).

4.1.3 NS1-ZIKV e NS1-DENV regulam de forma diferencial a expressão de enzimas envolvidas na resposta inflamatória e moléculas de adesão no segmento inicial e cauda do epidídimo.

Para caracterizar o perfil de expressão das enzimas e das moléculas de adesão envolvidas no processo de regulação da resposta inflamatória do LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV, analisamos as enzimas *Ptgs1* (*Cox1*), *Ptgs2* (*Cox2*) e *Ido1*, e as moléculas de adesão *Icam1* e *Vcam1*.

O LPS regulou positivamente os níveis relativos do transcrito *Ptgs2* (>1,8 vezes, $p=0,0435$), *Icam1* (>3 vezes, $p=0,0001$) e *Vcam1* (>3 vezes, $p=0,0012$) no segmento inicial (Figura 12 e Tabela Suplementar S9). Em paralelo, o LPS reduziu os níveis relativos do transcrito *Ptgs1* (<1,6 vezes, $p=0,0017$) e induziu os de *Icam1* (>2,5 vezes, $p=0,0431$) e *Vcam1* (>3,4 vezes, $p=0,0020$) na cauda do epidídimo (Figura 12 e Tabela Suplementar S9).

Embora o efeito do LPS sobre os níveis relativos do transcrito *Ptgs2* não tenha sido estatisticamente significativo, observamos uma tendência de aumento na sua expressão cauda do epidídimo ($>1,5$ vezes, $p=0,0747$) (Figura 12 e Tabela Suplementar S9).

Por sua vez, a NS1-ZIKV não regulou os níveis relativos dos transcritos *Ptgs1*, *Ptgs2*, *Ido1*, *Icam1* e *Vcam1* no segmento inicial. Embora o efeito da NS1-ZIKV sobre os níveis relativos do transcrito *Ptgs2* não tenha sido estatisticamente significativo, observamos uma tendência de aumento na sua expressão segmento inicial ($>1,7$ vezes, $p=0,0718$) (Figura 12 e Tabela Suplementar S9). Em paralelo, a NS1-ZIKV regulou positivamente os níveis relativos de *Ido1* ($>3,3$ vezes, $p=0,0005$) na cauda do epidídimo (Figura 12 e Tabela Suplementar S9). Embora o efeito da NS1-ZIKV sobre os níveis relativos do transcrito *Vcam1* não tenha sido estatisticamente significativo, observamos aumento biológico na sua expressão na cauda do epidídimo ($>2,5$ vezes, $p=0,0662$) (Figura 12 e Tabela Suplementar S9).

Já a NS1-DENV não regulou os níveis relativos dos transcritos *Ptgs1*, *Ptgs2*, *Ido1*, *Icam1* e *Vcam1* no segmento inicial (Figura 12 e Tabela Suplementar S9). Em paralelo, a NS1-DENV regulou positivamente os níveis relativos do transcrito *Ptgs2* ($>1,7$ vezes, $p=0,0427$) e *Vcam1* (>3 vezes, $p=0,0196$) na cauda do epidídimo (Figura 12 e Tabela Suplementar S9).

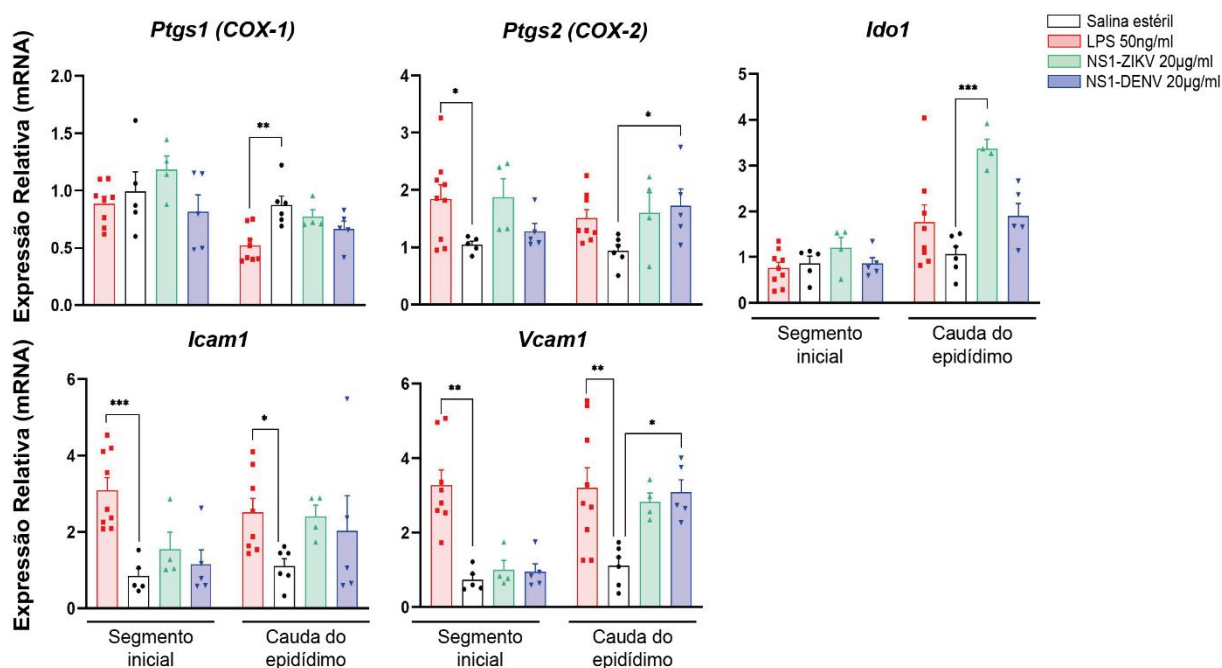


Figura 12. Perfil de expressão de enzimas e moléculas de adesão envolvidas no processo de regulação da resposta inflamatória e imunológica no segmento inicial e cauda do epidídimo frente ao estímulo inflamatório durante 3 h por LPS (50 ng/ml), NS1-ZIKV e NS1-DENV (20 µg/ml). Os valores foram normalizados utilizando o transcrito *Hprt1* como controle endógeno e expressos em relação à quantidade de mRNA determinada no grupo controle salina estéril. Os valores foram expressos como média $\pm$ SEM $n=4-9$ / grupo. Quantidade de asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparado ao controle salina estéril (* $p<0.05$; ** $p<0.005$; **** $p<0.0001$; One-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni).

4.1.4 NS1-ZIKV e NS1-DENV regulam negativamente a expressão de moléculas associadas à integridade de barreira hemato-epididimária no segmento inicial e cauda do epidídimo.

A fim de caracterizar o perfil de expressão de genes envolvidos em processos de integridade de barreira hemato-epididimária mediante do estímulo das proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV no segmento inicial e cauda do epidídimo, realizamos ensaios de RT-qPCR para analisar cinco diferentes moléculas que possuem um papel essencial na manutenção e homeostasia da barreira hemato-epididimária (*Gja1*, *Cldn1*, *Cldn3*, *Cldn8* e *Cdh1*).

O LPS regulou negativamente os níveis relativos dos transcritos *Cldn1* (<2 vezes, $p=0,0164$) e de *Cdh1* (<1,9 vezes, $p=0,077$) no segmento inicial (Figura 13 e Tabela Suplementar S10). Embora o efeito do LPS sobre os níveis relativos do transcrito *Cldn8* não tenha sido estatisticamente significativa, observamos uma tendência de diminuição na sua expressão no segmento inicial (<1,6 vezes, $p=0,0979$) (Figura 13 e Tabela Suplementar S10). O LPS também regulou negativamente os níveis relativos dos transcritos *Gja1* (<2,5 vezes, $p=0,0152$) e *Cldn8* (<1,8 vezes, $p=0,0472$) na cauda do epidídimo (Figura 13 e Tabela Suplementar S10). Embora o efeito do LPS sobre os níveis relativos do transcrito *Cdh1* não tenha sido estatisticamente significativa, observamos uma tendência de diminuição na sua expressão na cauda do epidídimo (<2,2 vezes, $p=0,0644$) (Figura 13 e Tabela Suplementar S10).

A NS1-ZIKV regulou negativamente os níveis relativos de *Gja1* (<3,9 vezes, $p=0,0297$), *Cldn1* (<5,7 vezes, $p=0,0006$), *Cldn3* (<3 vezes, $p=0,0405$), *Cldn8* (<3,5 vezes, $p=0,0061$) e *Cdh1* (<5,2 vezes, $p=0,0103$) no segmento inicial (Figura 13 e Tabela Suplementar S10). Em paralelo, a NS1-ZIKV também regulou negativamente os níveis relativos de *Gja1* (<4,1 vezes, $p<0,0001$), *Cldn1* (<3,1 vezes, $p=0,0112$), *Cldn3* (<3,18 vezes, $p=0,0012$), *Cldn8* (<6,1 vezes, $p<0,0001$) e *Cdh1* (<6,2 vezes, $p=0,0003$) na cauda do epidídimo (Figura 13 e Tabela Suplementar S10).

Por fim, a NS1-DENV regulou negativamente os níveis relativos de *Gja1* (<3,9 vezes, $p=0,0237$), *Cldn1* (<5,4 vezes, $p=0,0005$), *Cldn3* (<3,4 vezes, $p=0,0166$), *Cldn8* (<2,8 vezes, $p=0,0077$) e *Cdh1* (<2,8 vezes, $p=0,0027$) no segmento inicial (Figura 13 e Tabela Suplementar S10). Em paralelo, a NS1-DENV também regulou negativamente os níveis relativos de *Gja1* (<2,1 vezes, $p=0,0456$), *Cldn1* (<2,9 vezes, $p=0,0146$), *Cldn3* (<2,2 vezes, $p=0,0325$), *Cldn8* (<3 vezes, $p=0,0045$) e *Cdh1* (<3,5 vezes, $p=0,0152$) na cauda do epidídimo (Figura 13 e Tabela Suplementar S10).

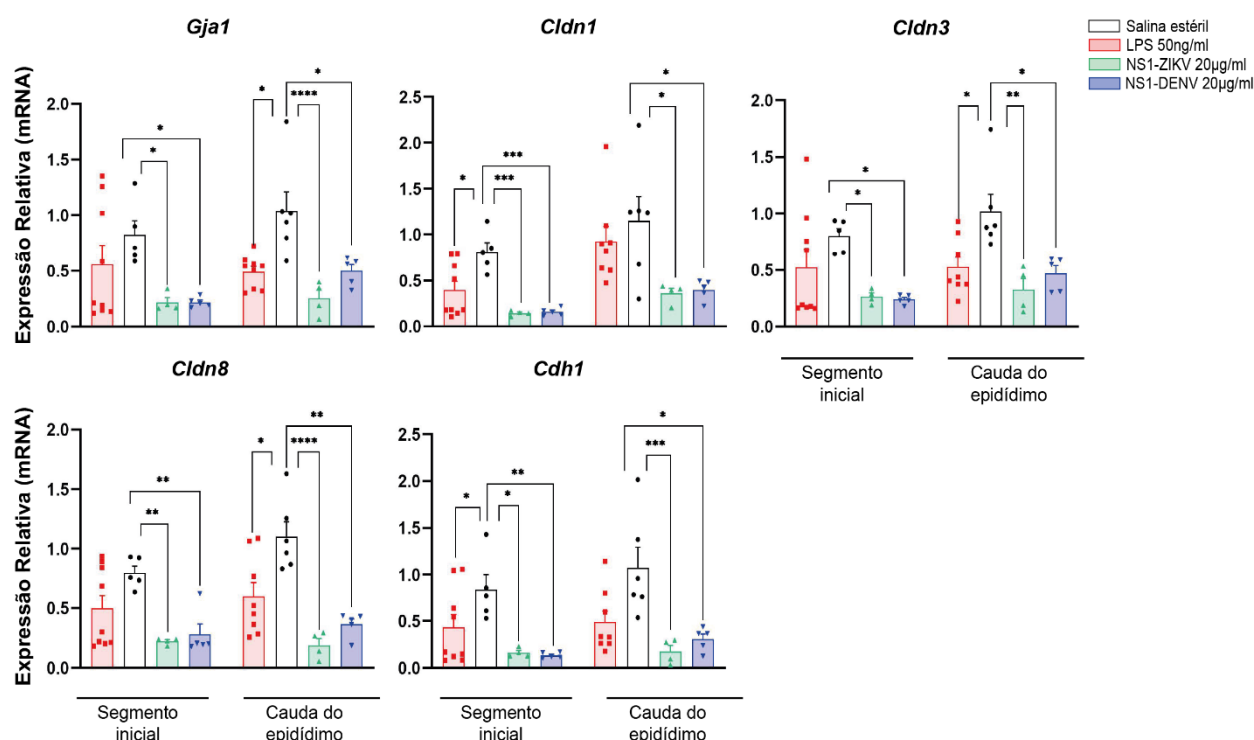


Figura 13. Perfil de expressão de moléculas envolvidas no processo de integridade de barreira hemato-epididimária no segmento inicial e cauda do epidídimo frente ao estímulo inflamatório durante 3 h por LPS (50 ng/ml), NS1-ZIKV e NS1-DENV (20 µg/ml). Os valores foram normalizados utilizando o transcrito *Hprt1* como controle endógeno e expressos em relação à quantidade de mRNA determinada no grupo controle salina estéril. Os valores foram expressos como média ± SEM n= 4-9 / grupo. Quantidade de asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparado ao controle salina estéril (**p < 0,005; ***p < 0,0005; ****p < 0,0001; One-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni).

4.1.5 CLI-095 preveniu os efeitos pela NS1-ZIKV e NS1-DENV sobre a expressão de mediadores inflamatórios apenas na cauda do epidídimo.

Para investigar o papel do receptor TLR4 na inflamação induzida pelas proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV, realizamos o pré-tratamento do segmento inicial e cauda do epidídimo por 1 h utilizando o inibidor de via TLR4 CLI-095 (3 µM), e analisamos os níveis de expressão relativa dos genes *Il6*, *Tnf*, *Il1b* e *Nfkb*. O pré-tratamento com CLI-095 preveniu a regulação positiva dos níveis relativos dos transcritos *Il6*, *Tnf*, *Il1b* e *Nfkb* induzidos pelo LPS no segmento inicial e na cauda do epidídimo, os quais permaneceram em níveis semelhantes ao controle salina estéril (Figura 14 e Tabela Suplementar S11).

Em paralelo, o pré-tratamento com CLI-095 não preveniu os efeitos da NS1-ZIKV e NS1-DENV sobre os níveis relativos dos transcritos *Tnf* e *Il1b* no segmento inicial, que se mantiveram elevados em relação ao grupo controle e em níveis semelhantes à exposição do tecido apenas às respectivas proteínas virais (Figura 14 e Tabela Suplementar S11). Em contraste, o pré-tratamento com CLI-095 preveniu efetivamente os efeitos da NS1-ZIKV sobre

os níveis dos transcritos *Il6*, *Tnf* e da NS1-DENV sobre os níveis dos transcritos *Il6*, *Tnf* e *Il1b* na cauda do epidídimo, os quais permaneceram em níveis semelhantes ao controle salina estéril (Figura 14 e Tabela Suplementar S11).

Não observamos regulação dos níveis relativos do transcrito *Nfkbia* no segmento inicial e na cauda do epidídimo exposto a NS1-ZIKV e NS1-DENV (Figura 14 e Tabela Suplementar S11).

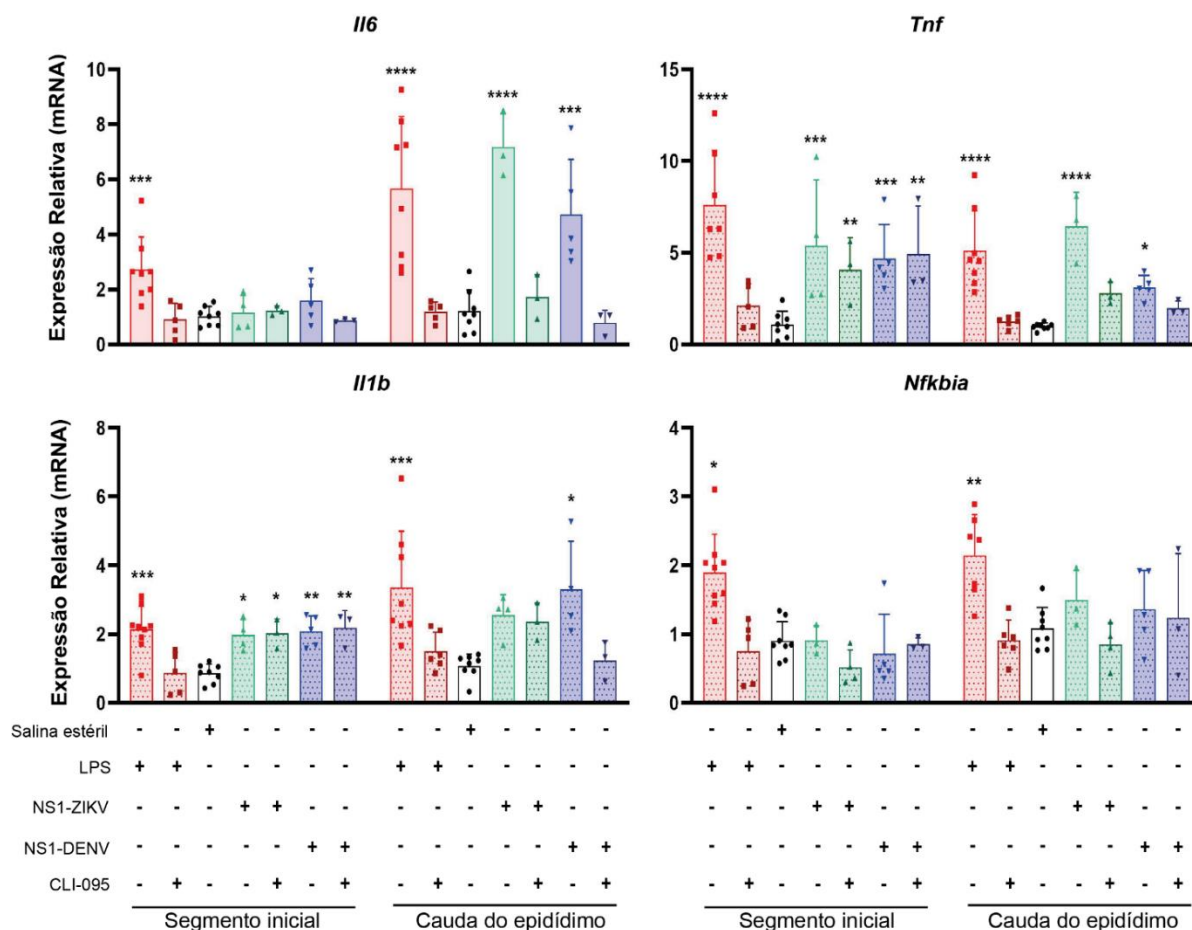


Figura 14. Prevenção da resposta inflamatória induzida durante 3 h por LPS (50 ng/ml), NS1-ZIKV e NS1-DENV (20 µg/ml) no segmento inicial e cauda do epidídimo de camundongos utilizando pré-tratamento por 1 h com o inibidor de via TLR4 CLI-095 (3 µM). Os valores foram normalizados utilizando o transcrito *Hprt1* como controle endógeno e expressos em relação à quantidade de mRNA determinada no grupo controle salina estéril. Os valores foram expressos como média ± SEM n= 3-9 / grupo. Quantidade de asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (*p < 0,05; **p < 0,005; ****p < 0,0001; One-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni).

4.1.6 NS1-ZIKV e NS1-DENV regulam negativamente a expressão de elementos da via de sinalização do TLR4 no segmento inicial e cauda do epidídimo

Após caracterizarmos o perfil de expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória pós inibição da via TLR4, procuramos caracterizar o perfil de expressão de genes envolvidos na via TLR nos grupos sem pré-tratamento de inibição de via. Para isso, analisamos o perfil de expressão de *Tlr4*, *Cd14*, *Myd88* e *Trif*.

O LPS regulou positivamente os níveis relativos dos transcritos *Tlr4* (>1,8 vezes, $p=0,0049$), *Cd14* (>2 vezes, $p=0,0004$) e *Trif* (>3,7 vezes $p<0,0001$) no segmento inicial (Figura 15 e Tabela Suplementar S12). Em paralelo, o LPS também regulou positivamente os níveis relativos dos transcritos *Tlr4* (>2,1 vezes, $p=0,0017$), *Cd14* (>2,1 vezes, $p=0,0016$) e *Trif* (>6,5 vezes, $p<0,0001$) na cauda do epidídimo. (Figura 15 e Tabela Suplementar S12).

A NS1-ZIKV regulou negativamente os níveis relativos dos transcritos *Tlr4* (<3,3 vezes, $p=0,0005$), *Cd14* (<2,7 vezes, $p=0,0007$) e *Myd88* (<3,1 vezes $p<0,0001$) no segmento inicial. Em paralelo, a NS1-ZIKV também regulou negativamente os níveis relativos do transcrito *Myd88* (<3,6 vezes, $p<0,0001$) na cauda do epidídimo (Figura 15 e Tabela Suplementar S12).

Por fim, a NS1-DENV regulou negativamente os níveis relativos dos transcritos *Tlr4* (<1,5 vezes, $p=0,0428$), *Cd14* (<2,8 vezes, $p=0,0002$) e *Myd88* (<3,1 vezes $p<0,0001$) no segmento inicial. Em paralelo, a NS1-DENV também regulou negativamente os níveis relativos do transcrito *Myd88* (<1,9 vezes, $p=0,0339$) na cauda do epidídimo (Figura 15 e Tabela Suplementar S12).

Após caracterização do perfil de expressão de genes envolvidos na ativação da via TLR4, buscamos investigar se as isoformas de NS1 estão regulando os níveis relativos do transcrito *Tlr3* por estar classicamente envolvido no reconhecimento de partículas virais. O transcrito *Tlr3* não teve seus níveis relativos sendo regulados por NS1-ZIKV e NS1-DENV no segmento inicial e na cauda do epidídimo (Tabela Suplementar S13 e Figura Suplementar S14).

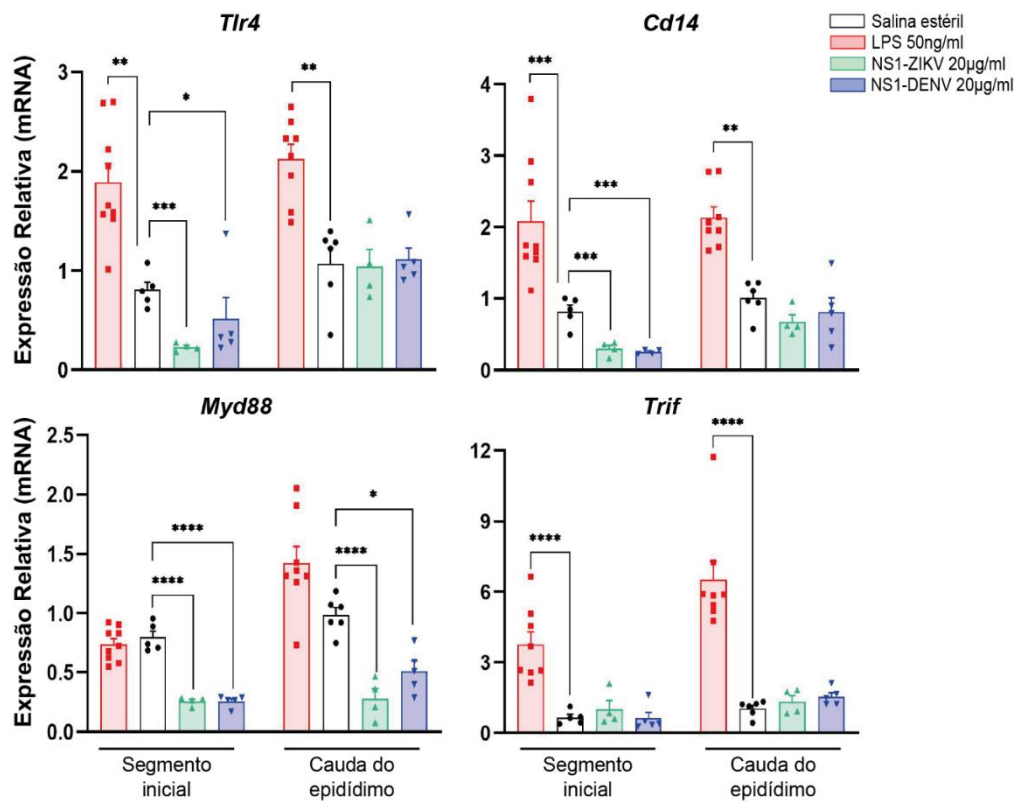


Figura 15. Perfil de expressão de genes classicamente envolvidos na ativação da via TLR4 no segmento inicial e cauda do epidídimo pós indução de epididimite durante 3 h por LPS (50 ng/ml), NS1-ZIKV e NS1-DENV (20 µg/ml). Os valores foram normalizados utilizando o transcrito *Hprt1* como controle endógeno e expressos em relação à quantidade de mRNA determinada no grupo controle salina estéril. Os valores foram expressos como média $\pm$ SEM $n= 4-8$ / grupo. Quantidade de asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparado ao controle salina estéril (** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$; One-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni).

4.2 Capítulo 2: Perfil de resposta inflamatória do epidídimo de camundongos Balb/c à infecção intracerebral de DENV-2 cepa NGC neuro adaptado

4.2.1 A infecção cerebral por DENV2 NGC regula positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias no epidídimo de camundongos

Devido os resultados que obtivemos com as proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV, buscamos investigar se o DENV-2 é capaz de gerar uma resposta inflamatória no epidídimo de camundongos infectados. Para isso, utilizamos o modelo *in vivo* de infecção, no qual os camundongos foram infectados com DENV-2 cepa NGC via intracerebral, e analisamos a expressão dos transcritos *Tnf*, *Ifnb1* e *Ifng*.

A infecção por DENV-2 regulou positivamente os níveis relativos de *Tnf*, mas não de *Ifnb1* e *Ifng*, no segmento inicial e cabeça do epidídimo após 4 dias (>6,6 e >7,2 vezes, respectivamente) e 5 dias (>2 e >13,8 vezes, respectivamente) (Figura 16). A expressão desse transcrito permaneceu elevada apenas no segmento inicial após 7 dias (>2 vezes) de infecção (Figura 16). Já nas regiões distais do epidídimo, a infecção por DENV-2 regulou positivamente os níveis relativos de *Tnf* após 4 dias (>62,8 vezes), 5 dias (>52,44 vezes) e 7 dias (>8,4 vezes); de *Ifnb1* após 4 dias (>88 vezes) e 5 dias (>70 vezes); e de *Ifng* após 4 dias (>19 vezes), 5 dias (>16 vezes) e 7 dias (>3 vezes) no corpo do epidídimo (Figura 16). Por fim, a infecção por DENV-2 regulou positivamente os níveis relativos de *Tnf* após 4 dias (>4,1 vezes) e 5 dias (>13,9 vezes); e de *Ifnb1* após 4 dias (>13 vezes) e 5 dias (>72 vezes) na cauda do epidídimo (Figura 16).

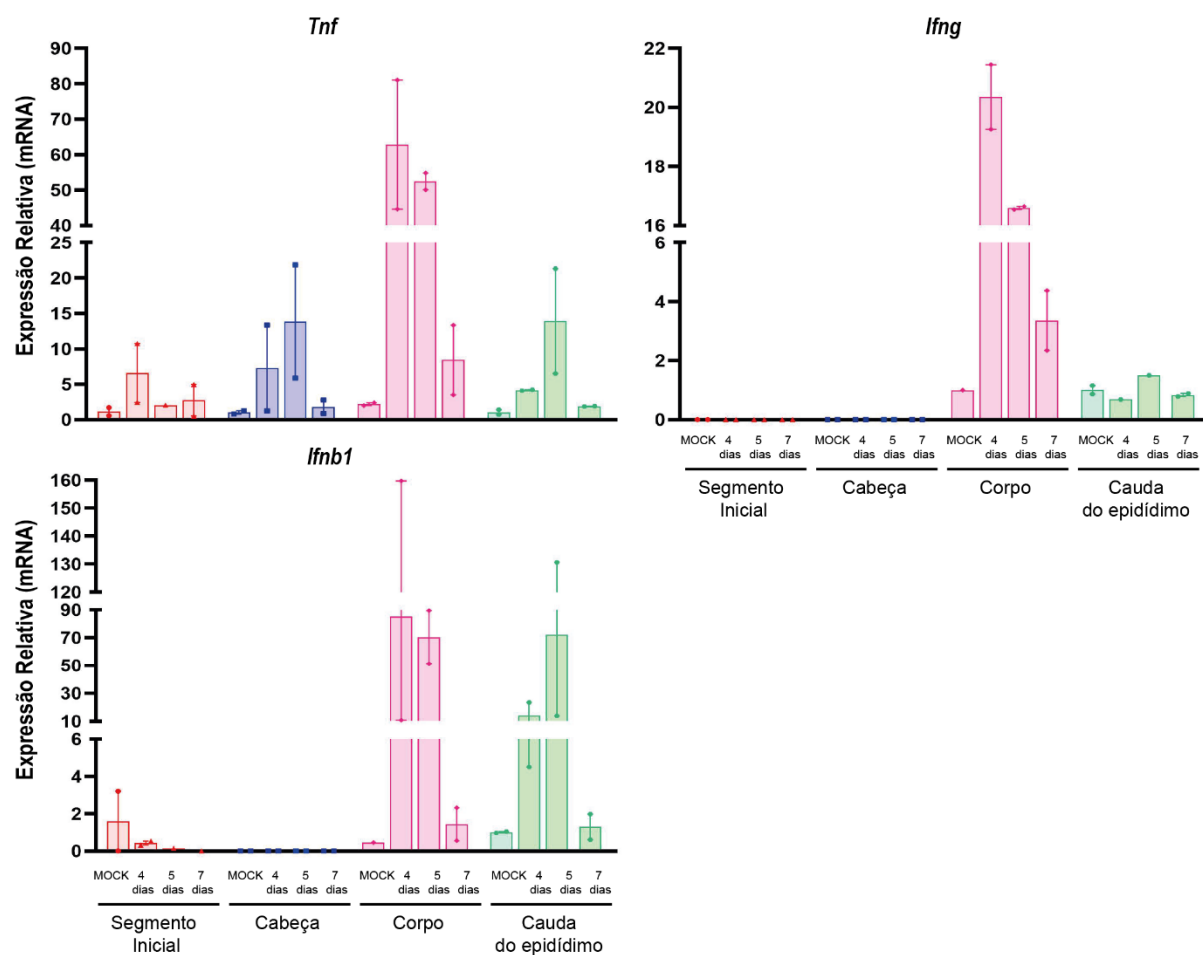


Figura 16. Resposta inflamatória induzida pela infecção por DENV-2 NGC neuroadaptado durante 4, 5 e 7 dias no segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de camundongos. Os valores foram normalizados utilizando o transcrito *Hprt1* como controle endógeno e expressos em relação à quantidade de mRNA determinada no grupo controle MOCK. Os valores foram expressos como média $\pm$ SEM $n = 2$ / grupo.

Discussão

5. Discussão

Inflamações em órgãos do trato reprodutor masculino, como o epidídimo, são comuns em homens de variadas faixas etárias, representando um dos principais contribuintes para casos de infertilidade masculina (Nicholson et al., 2010; Pilatz et al., 2015). Embora as infecções bacterianas sejam tradicionalmente o fator etiológico mais prevalente da epididimite, avanços nos métodos de diagnóstico molecular têm revelado que infecções virais são uma causa significativa desta condição (Browne et al., 2018; Pleuger et al., 2020). Diversos tipos de vírus, como ZIKV, têm demonstrado um forte tropismo pelo sistema reprodutor masculino (Dejucq & Jégou, 2001), com potencial de prejudicar a fertilidade masculina e possibilitar a transmissão por via sexual (Gimenes et al., 2014). A recente epidemia causada por ZIKV na década passada revelou que o vírus possui capacidade de se replicar no testículo e no epidídimo, resultando em inflamação severa nesses órgãos (Browne et al., 2018; Govero et al., 2016; Ma et al., 2017; Shen et al., 2021). Outro flavivírus de alta relevância epidemiológica é o DENV, cujas implicações no sistema reprodutor masculino ainda permanecem pouco conhecidas. Recentemente, estudos demonstraram a presença de RNA viral de DENV no sêmen de pacientes, e houve o relato de uma possível transmissão sexual de DENV (Mons et al., 2022; European Centre For Disease Prevention and Control., 2019; Iannetta et al., 2017; Lalle et al., 2018). Portanto, pesquisas acerca do aprofundamento sobre os mecanismos de defesa do sistema reprodutor masculino contra infecções virais são essenciais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a prevenção e o tratamento de possíveis consequências das infecções virais sobre a saúde reprodutiva masculina.

No presente estudo, investigamos se as proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV são capazes de induzir resposta inflamatória no epidídimo de camundongos, via ativação do receptor TLR4. Para tal, utilizamos um modelo de epididimite *ex vivo* previamente padronizado em nosso laboratório (Andrade et al., 2024), o que nos permitiu observar as respostas no órgão alvo de maneira localizada e isolada frente ao estímulo inflamatório gerado pelas proteínas NS1 de ZIKV e DENV sem a interferência de respostas sistêmicas. Dessa forma, nosso estudo permitiu avançar sobre os mecanismos pelos quais o epidídimo responde a infecções por esses flavivírus. A proteína NS1 do ZIKV e DENV desempenha papel fundamental no processo de invasão do sistema imunológico dos hospedeiros, sendo considerada uma proteína chave para essas infecções virais (Falgout et al., 1989). Estudos demonstraram que a NS1-DENV (10 µg/ml à 40 µg/ml) regulou positivamente níveis de expressão relativa de *Tnf* e *Il6*, em células endoteliais humanas (Modhiran et al., 2015). Nossos achados se alinham a estes estudos, visto que demonstramos que as proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV regulam positivamente genes classicamente envolvidos no processo de inflamação no segmento inicial e cauda do epidídimo em faixas de concentração similares. Portanto, nossos resultados

sugerem que a NS1 possui uma contribuição significativa para o desenvolvimento fisiopatológico das infecções por ZIKV e DENV no epidídimo.

A inflamação induzida por LPS do segmento inicial e da cauda do epidídimo resulta em diferentes padrões de resposta de citocinas, como demonstrado pela regulação positiva de diferentes conjuntos de mediadores inflamatórios (Andrade et al., 2021, 2024; Michel et al., 2016; Pleuger et al., 2020; Rodrigues et al., 2008; Silva et al., 2018). Neste sentido, regiões proximais (segmento inicial e cabeça) do epidídimo parecem ser menos responsivas ao estímulo inflamatório, enquanto regiões distais (corpo e cauda) têm demonstrado possuir uma resposta imunológica mais intensa (Michel et al., 2016; Silva et al., 2018; Wijayarathna et al., 2020). Consistentemente, no presente modelo *ex vivo* de indução de epididimite viral, observamos que as isoformas de NS1-ZIKV e NS1-DENV foram capazes de regular de forma diferencial a expressão relativa de genes que codificam citocinas pró e anti-inflamatórias (*Il1b*, *Il10*, *Ifnb1* e *Ifng*), quimiocinas (*Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5* e *Cxcl2*), enzimas e adesão celular (*Ptgs2*, *Icam1* e *Vcam1*) no segmento inicial e na cauda do epidídimo. Estímulos de origem viral também induzem respostas inflamatória diferentes ao longo do órgão. De fato, observamos que, em termos de expressão relativa dos transcritos listados anteriormente, a resposta da cauda do epidídimo ao estímulo com NS1-ZIKV e NS1-DENV foi mais robusta do que a do segmento inicial. Esses resultados realçam as diferenças funcionais na capacidade de resposta imunológica entre regiões proximais e distais do epidídimo, corroborando com dados da literatura de que regiões distais do epidídimo possuem uma resposta inflamatória mais intensa comparativamente a regiões proximais (Andrade et al., 2021, 2024; Michel et al., 2016; Pleuger et al., 2020, 2022; Silva et al., 2018; Wijayarathna et al., 2020).

Estudos *in vivo* de indução de epididimite a partir da injeção de LPS no interstício do segmento inicial ou na luz do ducto deferente em direção à cauda do epidídimo demonstraram que ambas as regiões respondem rapidamente ao estímulo via aumento da concentração tecidual de citocinas e quimiocinas (IL1B, IL6, TNF, IFNG e IL10 no segmento inicial; IL1B, IL6, TNF e IL10 na cauda do epidídimo) 6 h após o tratamento (Andrade et al., 2021). Em meio de cultura organotípica, estudos observaram o perfil de produção de citocinas em diferentes regiões do epidídimo após estimulação por LPS *ex vivo* (Pleuger et al., 2022). Os resultados indicaram que a regiões distais (corpo e a cauda do epidídimo), mas não as proximais (segmento inicial e cabeça) do epidídimo mostraram uma regulação positiva significativa de IL1A, IL1B, TNF, CCL2, IL6 e IL10 após 6 h de exposição ao LPS (Pleuger et al., 2022). Nossos resultados revelaram que a concentração de CXCL2 e CCL3, tanto no segmento inicial quanto na cauda do epidídimo, excederam os limites de detecção indicando uma alta concentração dessas proteínas em meio de cultura organotípica em resposta à incubação com LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV por 3 h. Esse aumento significativo da

concentração de CXCL2 e CCL3 sugere uma inflamação localizada e uma resposta imunológica ativa nos tecidos analisados. Estas quimiocinas são secretadas pelo tecido inflamado para atrair células imunes para o local da inflamação e, possivelmente estão atuando modulando o ambiente tecidual, influenciando para a produção de outras moléculas inflamatórias (Baggiolini, 1998; Mantovani et al., 2006)

Por outro lado, outras citocinas (IL6, TNF, IL1B, IL10 e IFNG) e quimiocinas (CCL4 e CCL2) foram quantificadas e apresentaram aumento da concentração em meio de cultura organotípica, mas sem significância estatística. Isso pode ser devido a alguns fatores como por exemplo, tempo de indução da inflamação insuficiente para secreção de proteínas em meio de cultura organotípica. De fato, dados do nosso grupo mostraram padrão diferenciado de concentração de citocinas e quimiocinas no meio de cultura organotípica e extratos proteicos dos tecidos mantidos em cultura (Andrade, 2024). Dados apresentados na tese de doutorado de Andrade (2024) demonstraram que o desafio inflamatório com LPS pelo modelo de epididimite *ex vivo* produziu o aumento da concentração de IL6 no segmento inicial e de TNF, IL6, CCL3 e CXCL2 na cauda do epidídimo apenas 1 h após o estímulo. Sendo assim, nossos dados sugerem um perfil de concentração de citocinas em meio de cultura organotípica diferenciado entre regiões, onde possivelmente o tempo de desafio inflamatório contribua para a secreção e aumento de citocinas pró-inflamatórias em meio de cultura, no qual no modelo que foi utilizado não se demonstre ser suficiente para tal. Por limitação da disponibilidade das proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV, não pudemos realizar ensaios adicionais para testar essa hipótese. Dessa forma, estudos adicionais devem ser realizados para aumento do n experimental, para a realização de uma curva temporal de desafio inflamatório, e realização do painel utilizando extratos proteicos das regiões epididimárias submetidas ao desafio inflamatório, a fim de elucidar os mecanismos envolvidos na secreção de citocinas em resposta à NS1 no epidídimo.

Além disso, outros elementos como enzimas, são importantes para investigar o processo de regulação inflamatória. A enzima indolamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) é conhecida pelas suas propriedades tolerantes e imunossupressoras, exercidas pela modulação das células dendríticas plasmocitoides e das células T reguladoras (Pallotta et al., 2011). Essa enzima catalisa a quebra do aminoácido triptofano, resultando na diminuição da disponibilidade desse substrato essencial para a proliferação das células T. Simultaneamente, facilita a produção de metabólitos imunossupressores, contribuindo para a manutenção da tolerância imunológica e a regulação do equilíbrio entre respostas pró e anti-inflamatórias (Munn & Mellor, 2007). Estudos anteriores demonstraram que *Ido1* está presente em níveis relativamente aumentados somente no segmento inicial/cabeça do epidídimo de camundongos, em condições normais (Fukunaga et al., 2012; Wijayarathna et al., 2022). Além

disso, foi demonstrado que IDO1 e seus metabólitos associados à quinurenina (KYN) participam do estabelecimento de um equilíbrio imunológico no segmento inicial/cabeça do epidídimo de camundongos, pois em camundongos *Ido1*^{-/-} ocorre o aumento significativo nas concentrações de diversas citocinas (IFNG, TNF, IL6 e IL1B) e quimiocinas (CCL3, CCL5, CCL11, CCL24, CCL25, CXCL9, CXCL11 e CX3CL1) pró-inflamatórias (Jrad-Lamine et al., 2013). Durante o estímulo inflamatório por NS1-ZIKV observamos aumento dos níveis relativos deste transcrito na cauda do epidídimo, enquanto no segmento inicial os níveis relativos permaneceram inalterados. Esse resultado pode sugerir um mecanismo imunomodulatório para abrandamento da inflamação ativa, levando em consideração que a resposta inflamatória de regiões distais possui respostas imunológicas mais intensas. A NS1-DENV não regulou os níveis relativos de *Ido1*, o que sugere que outros mecanismos podem estar envolvidos para o abrandamento da resposta inflamatória, ou que o tempo de indução de inflamação não foi suficiente para sua regulação.

Diversos estudos têm buscado compreender os impactos funcionais e histológicos que as infecções virais podem gerar nos órgãos do sistema reprodutor masculino. Govero e colaboradores demonstraram que a persistência do ZIKV nos testículos e epidídimos de camundongos foi associada a lesões teciduais severas, o que causou a diminuição das concentrações de testosterona e inibina B, e oligospermia (Govero et al., 2016). Este mesmo estudo demonstrou que o ZIKV infecta preferencialmente espermatogônias, espermatócitos primários e células de Sertoli, resultando em morte celular e destruição dos túbulos seminíferos (Govero et al., 2016). Outro estudo demonstrou que a infecção por ZIKV gera o desenvolvimento de orquite aguda em camundongos, e as alterações histopatológicas, que incluem intensa infiltração leucocitária, congestão no interstício dos testículos, ruptura de túbulos seminíferos, células germinativas degeneradas e células de Leydig necróticas (Ma et al., 2017). As lesões relatadas podem ser acompanhadas de degradação e perda da homeostasia da barreira hemato-testicular. Notavelmente, a disseminação do processo inflamatório para o epidídimo também pode prejudicar a BEB, que é elemento essencial para manutenção do microambiente luminal, homeostasia tecidual e o balanço imunológico no epidídimo (Avellar et al., 2019; Hinton & Palladino, 1995; Mital et al., 2011). A perda da integridade da BEB pode desencadear uma série de consequências para o epidídimo, incluindo agravamento da inflamação, acompanhado de lesões histopatológicas e comprometimento da função reprodutiva.

Dentre os componentes que constituem em BEB, destacamos o *Gja1*, *Cldn1*, *Cldn3*, *Cldn8* e *Cdh1*. A *Gja1* codifica a conexina 43, proteína responsável por formar os canais de junção comunicantes entre células adjacentes, permitindo a comunicação direta e a transferência de moléculas, íons e sinais entre células. Esta proteína desempenha papéis

importantes na comunicação intercelular e na regulação de funções epididimárias (Han & Lee, 2013; Li et al., 2009). As claudinas *Cldn1*, *Cldn3* e *Cldn8* são membros de uma família de proteínas transmembranares que desempenham papel na formação das junções de oclusão, contribuindo para a formação da barreira epitelial e endotelial, além disso, auxiliam na regulação do transporte de íons e moléculas (Van Itallie & Anderson, 2006). Já a *Cdh1* codifica a e-caderina, que desempenha um papel vital na adesão celular e na manutenção da integridade dos tecidos (Halbleib & Nelson, 2006). Estudos demonstraram que a infecção por ZIKV foi capaz de romper a estrutura epitelial do epidídimo de camundongos especialmente a região proximal. Também foram detectados detritos celulares na luz do ducto e outras alterações morfológicas, como aumento do diâmetro luminal, e degradação da barreira hemato-epididimária, sugerindo que a infecção por ZIKV destruiu a estrutura epididimária necessária para a maturação e transporte de espermatozoides (Sheng et al., 2021). Os resultados do nosso estudo nos permitem inferir que, pelo menos, parte das alterações da BEB induzida pelo ZIKV é causada pela resposta tecidual à proteína NS1. De fato, demonstramos que tanto a NS1-ZIKV quanto a NS1-DENV regularam negativamente genes que são intimamente ligados à função e composição da BEB no segmento inicial e na cauda do epidídimo, sugerindo que a integridade e homeostasia do microambiente epididimário possam estar sendo comprometidos devido ao estímulo inflamatório vigente. Estudos mais aprofundados devem ser realizados, para que seja mensurado em nível proteico e histológico o comprometimento da BEB e seus agravantes.

As respostas inflamatórias e os mecanismos imunorreguladores do epidídimo são regionalizados nas suas propriedade e eficácia (Hedger, 2011). Sabe-se que a imunidade inata antiviral é mediada por PRRs, que atuam no reconhecimento de diversos PAMPs. A ativação de TLR's é parte dos eventos iniciais da cascata inflamatória e do desencadeamento de resposta imunológica contra agentes patogênicos (Bhushan et al., 2009; Palladino et al., 2007). Como já mencionado, estudos recentes identificaram que a NS1-DENV é um PAMP viral reconhecido pelo TLR4 (Modhiran et al., 2015). No presente projeto buscamos entender o papel do receptor TLR4 frente o desafio inflamatório mediado pelas isoformas NS1-ZIKV e NS1-DENV. Para isso utilizamos o inibidor de via TLR4 CLI-095, também conhecido como TAK-242, e atua bloqueando a sinalização mediada pelo domínio intracelular do TLR4; mais precisamente liga-se à cisteína 747 na esfera intracelular do TLR, impedindo as vias dependentes de MyD88 e de TRIF (Kawamoto et al., 2008). Demonstramos que o segmento inicial e a cauda do epidídimo respondem diferencialmente à inflamação induzida pela NS1-ZIKV e NS1-DENV, sendo parcialmente dependente da via TLR4 na cauda do epidídimo. Também demonstramos que outros genes envolvidos na via TLR4, como *Cd14*, *MyD88* e *Trif* não tiveram seus níveis de expressão relativa modulados no segmento inicial e na cauda do

epidídimo. Chen e colaboradores demonstraram que a NS1-DENV é reconhecida pelas vias TLR2 e TLR6 em células PBMC (do inglês "*Peripheral Blood Mononuclear Cells*"), levando ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL6 e TNF), além disso, a interação NS1/TLR6 desempenha um papel importante na imunopatogênese da doença, contribuindo para o agravamento das infecções (Chen et al., 2015). Desta forma, o reconhecimento da NS1 via TLR2 e TLR6 emerge como um possível mecanismo pelo qual a NS1-ZIKV e NS1-DENV possam estar sendo reconhecidas pelo segmento inicial, culminando no aumento de mediadores pró-inflamatórios. Portanto, estudos adicionais deverão ser realizados para elucidar a níveis proteicos o papel do TLR4 e possivelmente outros TLRs diante do desafio inflamatório viral, além de explorar os fatores que transcrição que possam estar envolvidos nos mecanismos de cascata inflamatória induzida pelas proteínas virais. Outro TLR que está intimamente ligado ao reconhecimento de partículas virais é o TLR3 (Schröder & Bowie, 2005), mas não observamos uma regulação deste transcrito no presente modelo de inflamação. É importante ressaltar que a falta de regulação do transcrito *Tlr3* pelas isoformas de NS1 no presente modelo de inflamação não descarta sua possível participação nos processos de reconhecimento viral. Para uma compreensão mais abrangente destes mecanismos, estudos complementares devem ser conduzidos em diferentes tempos de indução, e modelos experimentais para de investigar o papel desse receptor na resposta inflamatória induzida pelas isoformas de NS1.

Os estudos realizados a fim de explorar os impactos da inflamação induzida pelas proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV no epidídimo de camundongos geraram resultados importantes para o entendimento da fisiopatologia da epididimite viral e contribuiu significativamente para o início da caracterização do impacto da doença no sistema reprodutor masculino. Porém, o modelo experimental que utilizamos é localizado e isolado, sendo assim, surgiu a necessidade de se realizar um estudo *in vivo* para avaliar o perfil de expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória induzida pelo vírus da DENV no sistema reprodutor masculino.

Buscamos caracterizar o perfil de expressão de citocinas e interferons no epidídimo de camundongos induzido pela infecção intracerebral de DENV-2 cepa NGC, e demonstramos que genes envolvidos na resposta inflamatória aguda foram regulados no epidídimo de camundongos infectados por DENV-2 em diferentes dias pós-infecção. Estudos recentes demonstraram que em casos graves da doença em indivíduos post-mortem foram evidenciados níveis aumentados de células que expressam citocinas pró-inflamatórias como *Ifng* e *Tnf* em amostras de fígado, pulmão e rim (Póvoa et al., 2016). Recentemente uma nova hipótese tem dito que a internalização do vírus DENV mediado por receptores Fcγ suprime as respostas antivirais mediadas por interferons do tipo I, inibindo genes antivirais e aumentando

a produção de IL10, que suprime o IFN via de sinalização γ e promove respostas T-helper 2 (Halstead et al., 2010; Ubol et al., 2010; Ubol & Halstead, 2010). Respostas T-helper-1 são necessárias para a eliminação do vírus. No entanto, as respostas do T-helper-2 têm efeito antiviral limitado e aumentam a produção de anticorpos subneutralizantes podendo levar a altos níveis de cargas virais e anticorpos subneutralizantes em pacientes com dengue. Além da amplificação da produção viral, todos esses mecanismos aumentam a produção de citocinas, quimiocinas e apoptose celular (Brown et al., 2006, 2012; King et al., 2002). Nossos estudos com a isoforma de proteína NS1-DENV demonstraram aumento dos níveis de expressão relativa do gene *Il10* na cauda do epidídimo, além de também regular positivamente os níveis de expressão relativa de *Ifnb1* e *Ifng* no segmento inicial e na cauda do epidídimo. Em concordância com nossos achados anteriores, a tendência de aumento dos níveis de expressão relativa de IFN nos segmentos distais do epidídimo induzidos pela infecção por DENV-2 emergem como uma descoberta importante para um maior entendimento da fisiopatologia da doença no sistema reprodutor masculino. Esses resultados nos encorajam a seguir investigações sobre os possíveis efeitos do DENV no trato reprodutor masculino, um tema negligenciado, apesar da frequência de epidemias por esse vírus, como a que estamos vivenciando no Brasil em 2024.

Conclusão

6. Conclusão

Nossos resultados nos permitem concluir que a NS1-ZIKV e a NS1-DENV desempenham uma função crucial na regulação gênica e no aumento das moléculas envolvidas na inflamação aguda do epidídimo, atuando como padrões moleculares associados a essas infecções virais. Estas proteínas são, possivelmente, essenciais para o reconhecimento dos vírus ZIKV e DENV no epidídimo de camundongos, contribuindo significativamente para a progressão da fisiopatologia da doença. Ambas as proteínas NS1 desempenham uma regulação diferenciada de resposta imunológica entre as regiões proximais e distais do epidídimo, e geram comprometimentos relacionados à integridade e homeostasia do microambiente epididimário. Além disso, as regiões proximais e distais do epidídimo respondem diferencialmente à inflamação induzida pelas isoformas de NS1 dos flavivírus ZIKV e DENV, sendo parcialmente dependente da via TLR4 na cauda do epidídimo. Esses resultados sustentam nossa hipótese de que a proteína NS1 do DENV e do ZIKV desencadeiam resposta inflamatória no epidídimo de camundongos via ativação TLR4. O desafio inflamatório mediado pela infecção de DENV-2 intracerebral, demonstrou que o vírus DENV é capaz de mediar a regulação gênica e o aumento das moléculas envolvidas na inflamação aguda do epidídimo.

Os resultados do presente estudo emergem com uma alta relevância para o entendimento da fisiopatologia de doenças virais no sistema reprodutor masculino e suas implicações na fertilidade. Portanto, o presente cenário estimula a realização de novos estudos, visando aprofundar o entendimento dos papéis mecanísticos das proteínas não-estruturais virais, bem como o impacto das infecções virais de forma mais ampla na fisiopatologia da epididimite.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- Akey, D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T. J., Delproposto, J., Ogata, C. M., Skinotis, G., Kuhn, R. J., & Smith, J. L. (2014). Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. **Science**, 343(6173), 881–885. <https://doi.org/10.1126/science.1247749>
- Akey, D. L., Brown, W. C., Jose, J., Kuhn, R. J., & Smith, J. L. (2015). Structure-guided insights on the role of NS1 in flavivirus infection. **BioEssays**, 37(5), 489–494. <https://doi.org/10.1002/bies.201400182>
- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., & Flamand, M. (2002). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. **J. Clin. Microbiol.**, 40(2), 376–381. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.376-381.2002>
- Amorim, J. F. S., Azevedo, A. S., Costa, S. M., Trindade, G. F., Basílio-de-Oliveira, C. A., Gonçalves, A. J. S., Salomão, N. G., Rabelo, K., Amaral, R., Geraldo, L. H. M., Lima, F. R. S., Mohana-Borges, R., Paes, M. V., & Alves, A. M. B. (2019). Dengue infection in mice inoculated by the intracerebral route: neuropathological effects and identification of target cells for virus replication. **Sci. Rep.**, 9(1), 17926. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54474-7>
- Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2009). Physiology and function of the tight junction. **Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.**, 1(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002584>
- Andrade, A. D., Almeida, P. G. C., Mariani, N. A. P., Freitas, G. A., Kushima, H., Filadelpho, A. L., Spadella, M. A., Avellar, M. C. W., & Silva, E. J. R. (2021). Lipopolysaccharide-induced epididymitis modifies the transcriptional profile of Wfdc genes in mice. **Biol. Reprod.**, 104(1), 144–158. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa189>
- Andrade, A. D., Almeida, P. G. C., Mariani, N. A. P., Santos, N. C. M., Camargo, I. A., Martini, P. V., Kushima, H., Ai, D., Avellar, M. C. W., Meinhardt, A., Pleuger, C., & Silva, E. J. R. (2024). Regional modulation of toll-like receptor signaling pathway genes in acute epididymitis in mice. **Andrology**, 1–14. <https://doi.org/10.1111/andr.13630>
- Apte-Sengupta, S., Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2014). Coupling of replication and assembly in flaviviruses. **Curr. Opin. Virol.**, 9, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.09.020>
- Avellar, M. C. W., & Hinton, B. T. (2019). Epididymis. Em I. Huhtaniemi & L. Martini (Orgs.), **Encyclopedia of Endocrine Diseases: Vol. Second Edition** (Second Edition, p. 807–813). Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65180-2>
- Avellar, M. C. W., Ribeiro, C. M., Dias-da-Silva, M. R., & Silva, E. J. R. (2019). In search of new paradigms for epididymal health and disease: innate immunity, inflammatory mediators, and steroid hormones. **Andrology**, 7(5), 690–702. <https://doi.org/10.1111/andr.12654>
- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, 392(6676), 565–568. <https://doi.org/10.1038/33340>
- Barthel, A., Gourinat, A.-C., Cazorla, C., Joubert, C., Dupont-Rouzeyrol, M., & Descloux, E. (2013). Breast milk as a possible route of vertical transmission of dengue virus? **Clin. Infect. Dis.**, 57, 415–417. <https://doi.org/10.1093/cid/cit227>
- Barzon, I., Pacenti, M., Franchin, E., Lavezzo, E., Trevisan, M., Sgarabotto, D., & Palú, G. (2016). 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**, 21(32), 6–18. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917>

- Battistone, M. A., Spallanzani, R. G., Mendelsohn, A. C., Capen, D., Nair, A. V., Brown, D., & Breton, S. (2019). Novel role of proton-secreting epithelial cells in sperm maturation and mucosal immunity. *J. Cell Sci.*, 133(5). <https://doi.org/10.1242/JCS.233239>
- Baud, D. (2017). An update on Zika virus infection. *Lancet*, 390(10107), 2099–2109. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31450-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31450-2)
- Belleannée, C., Thimon, V., & Sullivan, R. (2012). Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Res.*, 349(3), 717–731. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1381-0>
- Bhushan, S., Schuppe, H. C., Fijak, M., & Meinhardt, A. (2009). Testicular infection: microorganisms, clinical implications and host-pathogen interaction. *J. Reprod. Immun.*, 83(1–2), 164–167. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.07.007>
- Bhushan, S., Tchatalbachev, S., Klug, J., Fijak, M., Pineau, C., Chakraborty, T., & Meinhardt, A. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* Block MyD88-Dependent and Activate MyD88-Independent Signaling Pathways in Rat Testicular Cells. *J. Immunol.*, 180(8), 5537–5547. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5537>
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard B, Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., Lamballerie, X., Gould, E. A., Grard, G., Grimes, J. M., Hilgenfeld, R., Jansson, A. M., *et al.* (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.*, 87(2), 125–148. <https://doi.org/10.1016%2Fj.antiviral.2009.11.009>
- Brasil, P., Pereira, J. P., Moreira, M. E., Ribeiro Nogueira, R. M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R. S., Valderramos, S. G., Halai, U.-A., Salles, T. S., Zin, A. A., Horovitz, D., Daltro, P., Boechat, M., Raja Gabaglia, C., Carvalho de Sequeira, P., Pilotto, J. H., Medialdea-Carrera, R., Cotrim da Cunha, D., ... Nielsen-Saines, K. (2016). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *NEJM*, 375(24), 2321–2334. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1602412>
- Brown, M. G., King, C. A., Sherren, C., Marshall, J. S., & Anderson, R. (2006). A dominant role for FcγRII in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells and associated CCL5 release. *J. Leukoc. Biol.*, 80(6), 1242–1250. <https://doi.org/10.1189/jlb.0805441>
- Brown, M. G., McAlpine, S. M., Huang, Y. Y., Haidl, I. D., Al-Afif, A., Marshall, J. S., & Anderson, R. (2012). RNA Sensors Enable Human Mast Cell Anti-Viral Chemokine Production and IFN-Mediated Protection in Response to Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection. *PLoS ONE*, 7(3), e34055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034055>
- Browne, J. A., Leir, S. H., Eggen, S. E., & Harris, A. (2018). Region-specific innate antiviral responses of the human epididymis. *Mol. Cell Endocrinol.*, 473, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.01.004>
- Campos, G. C., Sardi, S. I., Sarno, M., & Brites, C. (2016). Zika virus infection, a new public health challenge. *BJID*, 20(3), 227–228. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.05.001>
- Cauchemez, S., Besnard, M., Bompard, P., Dub, T., Guillemette-Artur, P., Eyrolle-Guignot, D., Salje, H., Van Kerkhove, M. D., Abadie, V., Garel, C., Fontanet, A., & Mallet, H. P. (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: A retrospective study. *Lancet*, 387(10033), 2125–2132. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00651-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00651-6)
- Cavalcante, K. R. L. J., & Tauil, P. L. (2016). Epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil, 2000-2012. *Epidemiol Serv Saude*, 25(1), 10–11. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000100002>
- Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A. H., Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Hurtado-Monzon, A. M., Alcaraz-Estrada, S. L., Ludert, J. E., & Del Angel, R. M. (2015). Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: This interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells. *Virology*, 484, 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.05.017>

- Chan, J. F. W., Yip, C. C. Y., Tsang, J. O. L., Tee, K. M., Cai, J. P., Chik, K. K. H., Zhu, Z., Chan, C. C. S., Choi, G. K. Y., Sridhar, S., Zhang, A. J., Lu, G., *et al.* (2016). Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. ***Emerg. Microbes. Infect.***, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.99>
- Chaturvedi, U. C., & Nagar, R. (2008). Dengue and dengue haemorrhagic fever: indian perspective. ***J. Bioci.***, 33(4), 429–441. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0062-3>
- Chen, J., Ng, M. M. L., & Chu, J. J. H. (2015). Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. ***PLoS Pathog.***, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005053>
- Chen, L. H., & Wilson, M. E. (2004). Transmission of dengue virus without a mosquito vector: nosocomial mucocutaneous transmission and other routes of transmission. ***Clin. Infect. Dis.***, 39, e56–e60. <https://doi.org/10.1086/423807>
- Chua, J. J. E., Bhuvanankantham, R., Chow, V. T. K., & Ng, M. L. (2005). Recombinant non-structural 1 (NS1) protein of dengue-2 virus interacts with human STAT3 β protein. ***Virus Res.***, 112(1–2), 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.025>
- Citi, S. (1993). The molecular organization of tight junctions. ***J. Cell Biol.***, 121(3), 485–489. <https://doi.org/10.1083/jcb.121.3.485>
- Coelho, F. C., Durovni, B., Saraceni, V., Lemos, C., Codeco, C. T., Camargo, S., de Carvalho, L. M., Bastos, L., Arduini, D., & Villela, D. A. M. (2016). Higher incidence of Zika in adult women than adult men in Rio de Janeiro suggests a significant contribution of sexual transmission from men to women. ***Int. J. Infect. Dis.***, 51, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.023>
- Collyns, M. M., Stafford, R. S., O'Leary, M. P., & Barry, M. J. (1998). How common is prostatitis? A national survey of physician visits. ***J. Urol.***, 159(4), 1224–1228. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)63564-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)63564-X)
- Costa, S. M., Freire, M. S., & Alves, A. M. B. (2006). DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. ***Vaccine***, 24(21), 4562–4564. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.022>
- Cornwall, G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. ***Human. Reprod. Upd.***, 15(2), 213–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>
- Coyne, C. B., & Lazear, H. M. (2016). Zika virus-reigniting the TORCH. ***Nat. Rev. Microbiol.***, 14(11), 707–715. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.125>
- Culjat, M., Darling, S. E., Nerurkar, V. R., Ching, N., Kumar, M., Min, S. K., Wong, R., Grant, L., & Melish, M. E. (2016). Clinical and Imaging Findings in an Infant with Zika Embryopathy. ***Clin. Infect. Dis.***, 63(6), 805–811. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw324>
- Cyr, D. G., Gregory, M., Dubé, É., Dufresne, J., Chan, P. T. K., & Hermo, L. (2007). Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. ***Asian J. Androl.***, 9(4), 463–475. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00308.x>
- Cyr, D. G., Hermo, L., Blaschuk, O. W., & Robaire, B. (1992). Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis. ***Endocrinology***, 130(1), 353–363. <https://doi.org/10.1210/endo.130.1.1727709>
- Cyr, D. G., Hermo, L., Egenberger, N., Mertineit, C., Trasler, J. M., & Laird, D. W. (1999). Cellular Immunolocalization of Occludin during Embryonic and Postnatal Development of the Mouse Testis and Epididymis. ***Endocrinology***, 140(8), 3815–3825. <https://academic.oup.com/endo/article/140/8/3815/2990996>

Cyr, D. G., Hermo, L., & Robaire, B. (1993). Developmental changes in epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin during postnatal epididymal development in the rat. *Endocrinology*, 132(3), 1115–1124. <https://doi.org/10.1210/endo.132.3.7679970>

Da Silva, N., Cortez-Retamozo, V., Reinecker, H. C., Wildgruber, M., Hill, E., Brown, D., Swirski, F. K., Pittet, M. J., & Breton, S. (2011). A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction*, 141(5), 653–663. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0493>

Da Silva, N., & Smith, T. (2015). Exploring the role of mononuclear phagocytes in the epididymis. *Asian J. Androl.*, 17(4), 591. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153540>

Daep, C. A., Muñoz-Jordán, J. L., & Eugenín, E. A. (2014). Flaviviruses, an expanding threat in public health: focus on dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. *J. Neurovirol.*, 20(6), 539–560. <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0285-z>

DeBellefeuille, S., Hermo, L., Gregory, M., Dufresne, J., & Cyr, D. G. (2003). Catenins in the Rat Epididymis: Their Expression and Regulation in Adulthood and during Postnatal Development. *Endocrinology*, 144(11), 5040–5049. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0139>

Dejucq, N., & Jégou, B. (2001). Viruses in the Mammalian Male Genital Tract and Their Effects on the Reproductive System. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65(2), 208–231. <https://doi.org/10.1128/mmbr.65.2.208-231.2001>

Dubé, E., Chan, P. T. K., Hermo, L., & Cyr, D. G. (2007). Gene Expression Profiling and Its Relevance to the Blood-Epididymal Barrier in the Human Epididymis1. *Biol. Reprod.*, 76(6), 1034–1044. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059246>

Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M., & Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *NEJM*, 360(24). <https://doi.org/10.1056/nejmoa0805715>

Eickhoff, Frimodt-Møller, Walter, & Frimodt-Møller. (1999). A double-blind, randomized, controlled multicentre study to compare the efficacy of ciprofloxacin with pivampicillin as oral therapy for epididymitis in men over 40 years of age. *BJU Int.*, 84(7), 827–834. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.1999.00252.x>

Enis, D., Ash, N., Arzad, F., Ostashari, M., Nnie, A., Ine, F., Ames, J., Iller, M., Aniel O'l Eary, D., Urray, R. M., Da, A., Uang, H., Osenberg, M. R., Reenberg, B. G., Argaret, M., Herman, S., Usan, S., Ong, W., Arcelle, M., & Ayton, L. (2001). The outbreak of West Nile Virus infection in the New York City area in 1999. *NEJM*, 344(24). <https://doi.org/10.1056/nejm200106143442401>

European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). *Sexual transmission of dengue virus, Spain*.

Falgout, B., Chanock, R., & Lai, C.-J. (1989). Proper Processing of Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Requires the N-Terminal Hydrophobic Signal Sequence and the Downstream Nonstructural Protein NS2a. *J. Virol.*, 1852–1860. <https://doi.org/10.1128%2Fjvi.63.5.1852-1860.1989>

Flickinger, C. J., Bush, L. A., Howards, S. S., & Herr, J. C. (1997). Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat. Rec.*, 248(3), 380–390. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0185\(199707\)248:3%3C380::aid-ar11%3E3.0.co;2-I](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0185(199707)248:3%3C380::aid-ar11%3E3.0.co;2-I)

Foy, B. D., Kobylinski, K. C., Foy, J. L. C., Blitvich, B. J., Travassos da Rosa, A., Haddow, A. D., Lanciotti, R. S., & Tesh, R. B. (2011). Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.*, 17(5), 880–882. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101939>

- Fukunaga, M., Yamamoto, Y., Kawasoe, M., Arioka, Y., Murakami, Y., Hoshi, M., & Saito, K. (2012). Studies on tissue and cellular distribution of indoleamine 2,3-dioxygenase 2: The absence of IDO1 upregulates IDO2 expression in the epididymis. **J. Histochem. and Cytochem.**, 60(11), 854–860. <https://doi.org/10.1369/0022155412458926>
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., & Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. **J. Cell Biol.**, 156(6), 1099–1111. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110122>
- Gimenes, F., Souza, R. P., Bento, J. C., Teixeira, J. J. V., Maria-Engler, S. S., Bonini, M. G., & Consolaro, M. E. L. (2014). Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. **Nat. Ver. Urol.**, 11(12), 672–687. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.285>
- Girling, J. E., & Hedger, M. P. (2007). Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: emerging roles in reproductive physiology and pathology. **Immunol. Cell Biol.**, 85(6), 481–489. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100086>
- Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S. M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D. J., Gorman, M. J., Richner, J. M., Caine, E. A., Salazar, V., Moley, K. H., & Diamond, M. S. (2016). Zika virus infection damages the testes in mice. **Nature**, 540(7633), 438–442. <https://doi.org/10.1038/nature20556>
- Gregory, M., & Cyr, D. G. (2014). The blood-epididymis barrier and inflammation. **Spermatogenesis**, 4(2). <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979619>
- Gregory, M., Dufresne, J., Hermo, L., & Cyr, D. G. (2001). Claudin-1 Is Not Restricted to Tight Junctions in the Rat Epididymis. **Endocrinology**, 142(2), 854–863. <https://doi.org/10.1210/endo.142.2.7975>
- Guazzone, V. A., Jacobo, P., Theas, M. S., & Lustig, L. (2009). Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. **Microsc. Res. Tech.**, 72(8), 620–628. <https://doi.org/10.1002/jemt.20704>
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev.**, 11, 480–496. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.3.480>
- Gubler, D. J. (2007). The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. **Clin. Infect. Dis.**, 45(8), 1039–1046. <https://doi.org/10.1086/521911>
- Halbleib, J. M., & Nelson, W. J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. **Genes Dev.**, 20(23), 3199–3214. <https://doi.org/10.1101/gad.1486806>
- Halstead, S. B., Mahalingam, S., Marovich, M. A., Ubol, S., & Mosser, D. M. (2010). Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: Disease regulation by immune complexes. **Lancet Infect. Dis.**, 10(10), 712–722. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70166-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70166-3)
- Halstead, S. B., & O'Rourke, E. J. (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **J. Exp. Med.**, 146, 201–217.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombattana, P., Talignani, L., Thomas, F., Cao-Lormeau, V.-M., et al. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **J. Virol.**, 89(17), 8880–8896. <https://doi.org/10.1128/jvi.00354-15>
- Hamzeh, M., & Robaire, B. (2010). Identification of early response genes and pathway activated by androgens in the initial segment and caput regions of the regressed rat epididymis. **Endocrinology**, 151(9), 4504–4514. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0023>

- Han, S.-Y., & Lee, K.-H. (2013). The Expression Patterns of Connexin Isoforms in the Rat Caput Epididymis During Postnatal Development. *J. Anim. Sci. Technol.*, 55(4), 249–255. <https://doi.org/10.5187/JAST.2013.55.4.249>
- Hedger, M. P. (2011). Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J. Androl.*, 32(6), 625–640. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.012989>
- Hedger, M. P., & Hales, D. B. (2006). Immunophysiology of the Male Reproductive Tract. Em *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. (p. 805–892). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00019-3>
- Hennessey, M., Fischer, M., & Staples, J. E. (2016). Zika Virus spreads to New Areas - Region of the Americas, *MMWR*, 65(3), 55–58. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090442>
- Hinton, B. T., & Howards, S. S. (1981). Permeability characteristics of the epithelium in the rat caput epididymidis. *J. Reprod. Fert.*, 63, 95–99. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0630095>
- Hinton, B. T., & Palladino, M. A. (1995). Epididymal epithelium: Its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech.* <https://doi.org/10.1002/jemt.1070300106>
- Holmes, E. C., & Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect. Genet. Evol.*, 3, 19–28. [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(03\)00004-2](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(03)00004-2)
- Holschbach, C. (2002). A possible extratubular origin of epididymal basal cells in mice. *Reproduction*, 123(4), 517–525. <https://doi.org/10.1530/reprod/123.4.517>
- Hori, H., & Lai, C.-J. (1990). Cleavage of Dengue Virus NS1-NS2A Requires an Octapeptide Sequence at the C Terminus of NS1. *J. Virol.*, 64(9), 4573–4577. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.9.4573-4577.1990>
- Houzet, L., Pérez-Losada, M., Matusali, G., Deleage, C., Dereuddre-Bosquet, N., Satie, A.-P., Aubry, F., Becker, E., Jégou, B., Le Grand, R., Keele, B. F., Crandall, K. A., & Dejucq-Rainsford, N. (2018). Seminal Simian Immunodeficiency Virus in Chronically Infected Cynomolgus Macaques Is Dominated by Virus Originating from Multiple Genital Organs. *J. Virol.*, 92(14). <https://doi.org/10.1128/jvi.00133-18>
- Iannetta, M., Lalle, E., Musso, M., Carletti, F., Scorzolini, L., D'Abramo, A., Chinello, P., Castilletti, C., Ippolito, G., Capobianchi, M. R., & Nicastri, E. (2017). Persistent detection of dengue virus RNA in vaginal secretion of a woman returning from Sri Lanka to. *Euro Surveill*, 22(34). <https://doi.org/10.2807/1560>
- Jelinsky, S. A., Turner, T. T., Bang, H. J., Finger, J. N., Solarz, M. K., Wilson, E., Brown, E. L., Kopf, G. S., & Johnston, D. S. (2007). The rat epididymal transcriptome: Comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biol. Reprod.*, 76(4), 561–570. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.057323>
- Joguet, G., Mansuy, J.-M., Matusali, G., Hamdi, S., Walschaerts, M., Pavili, L., Guyomard, S., Prisant, N., Lamarre, P., Dejucq-Rainsford, N., Pasquier, C., & Bujan, L. (2017). Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *Lancet Infect. Dis.*, 17(11), 1200–1208. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30444-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30444-9)
- Johnston, D. S., Jelinsky, S. A., Bang, H. J., Dicaneloro, P., Wilson, E., Kopf, G. S., & Turner, T. T. (2005). The mouse epididymal transcriptome: Transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol. Reprod.*, 73(3), 404–413. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.039719>
- Jrad-Lamine, A., Henry-Berger, J., Damon-Soubeyrand, C., Saez F., Kocer, A., Janny, L. et al. (2013). Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (Ido1) is involved in the control of mouse caput epididymis immune environment. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066494>

- Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., & Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, 358(6365), 929–932. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 11(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Kawamoto, T., Ii, M., Kitazaki, T., Iizawa, Y., & Kimura, H. (2008). TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain. *Eur. J. Pharmacol.*, 584(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.026>
- King, C. A., Anderson, R., & Marshall, J. S. (2002). Dengue Virus Selectively Induces Human Mast Cell Chemokine Production. *J. Virol.*, 76(16), 8408–8419. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.16.8408-8419.2002>
- Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., Langer, J. A., Sheikh, F., Dickensheets, H., & Donnelly, R. P. (2003). IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.*, 4(1), 69–77. <https://doi.org/10.1038/ni875>
- Lalle, E., Colavita, F., Iannetta, M., Teklè, S. G., Carletti, F., Scorzolini, L., Bordini, L., Vincenti, D., Castilletti, C., Ippolito, G., Capobianchi, M. R., & Nicastri, E. (2018). Prolonged detection of dengue virus RNA in the semen of a man returning from Thailand to Italy, January 2018. *Euro Surveill*, 23(18). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.18.18-00197>
- Levy, S., & Robaire, B. (1999). Segment-Specific Changes with Age in the Expression of Junctional Proteins and the Permeability of the Blood-Epididymis Barrier in Rats. *Biol. Reprod.*, 60(6), 1392–1401. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1392>
- Li, M. W. M., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2009). Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood–testis barrier dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106(25), 10213–10218. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901700106>
- Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S.-S., Lee, S.-A., Ge, J., Wang, S., Goldman, S. A., Zlokovic, B. V., Zhao, Z., & Jung, J. U. (2016). Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem. Cell*, 19(5), 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>
- Lin, C.-F., Wan, S.-W., Cheng, H.-J., Lei, H.-Y., & Lin, Y.-S. (2006). Autoimmune Pathogenesis in Dengue Virus Infection. *Viral. Immunol.*, 19(2), 127–132. <https://doi.org/10.1089/vim.2006.19.127>
- Liu, Y., Liu, J., Du, S., Shan, C., Nie, K., Zhang, R., Li, X.-F., Zhang, R., Wang, T., Qin, C.-F., Wang, P., Shi, P.-Y., & Cheng, G. (2017). Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature*, 545(7655), 482–486. <https://doi.org/10.1038/nature22365>
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Ma, W., Li, S., Ma, S., Jia, L., Zhang, F., Zhang, Y., Zhang, J., Wong, G., Zhang, S., Lu, X., Liu, M., Yan, J., Li, W., Qin, C., Han, D., Qin, C., Wang, N., Li, X., & Gao, G. F. (2016). Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell*, 167(6), 1511–1524.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.016>
- Mackenzie, J. M., Jones, M. K., Young, P. R., & Sakzewski, A. (1996). Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. *Virology*, 220, 232–240. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0307>
- Mansuy, J. M., Suberbiellet, E., Chapuy-Regaud, S., Mengelle, C., Bujan, L., Marchou, B., Delobel, P., Gonzalez-Dunia, D., Malnou, C., Izopet, J., & Martin-Blondel, G. (2016). Zika virus in semen and spermatozoa. *J. Infect. Dis.*, 16, 1106–1107. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw078>

- Mantovani, A., Bonecchi, R., & Locati, M. (2006). Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat. Rev. Immunol.*, 6(12), 907–918. <https://doi.org/10.1038/nri1964>
- Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., & Ii, M. (2011). TAK-242 (Resatorvid), a Small-Molecule Inhibitor of Toll-Like Receptor (TLR) 4 Signaling, Binds Selectively to TLR4 and Interferes with Interactions between TLR4 and Its Adaptor Molecules. *Mol. Pharmacol.*, 79(1), 34–41. <https://doi.org/10.1124/mol.110.068064>
- McConaghy, J., & Panchal, B. (2016). Epididymitis: An Overview. *Am. Fam. Physician.*, 94, 723–726. PMID: 27929243
- Mège, R.-M., Gavard, J., & Lambert, M. (2006). Regulation of cell–cell junctions by the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 18(5), 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.08.004>
- Michel, V., Duan, Y., Stoschek, E., Bhushan, S., Middendorff, R., Young, J. M., Loveland, K. L., Kretser, D. M. D., Hedger, M. P., & Meinhardt, A. (2016). Uropathogenic Escherichia coli causes fibrotic remodelling of the epididymis. *J. Pathol.*, 240(1), 15–24. <https://doi.org/10.1002/path.4748>
- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host. & Microbe.*, 21(2), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>
- Ministério da Saúde. (2009). *Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.*
- Mital, P., Hinton, B. T., & Dufour, J. M. (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol. Reprod.*, 84(5), 851–858. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087452>
- Mrakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodusek, V., Vizjak, A., Pižem, J., Petrovec, M., & Avšič Županc, T. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *NEJM*, 374(10), 951–958. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1600651>
- Modhiran, N., Watterson, D., Blumenthal, A., Baxter, A. G., Young, P. R., & Stacey, K. J. (2017). Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunol. Cell Biol.*, 95(5), 491–495. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.5>
- Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D. A., Panetta, A. K., Sester, D. P., Liu, L., Hume, D. A., Stacey, K. J., & Young, P. R. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci. Transl. Med.*, 7, 304ra–30142 <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3863>
- Mons, J., Mahé-Poirion, D., Mansuy, J. M., Lheureux, H., Nigon, D., Moinard, N., Hamdi, S., Pasquier, C., Dejucq-Rainsford, N., & Bujan, L. (2022). Effects of Acute Dengue Infection on Sperm and Virus Clearance in Body Fluids of Men. *Emerg. Infect. Dis.*, 28(6), 1146–1153. <https://doi.org/10.3201/eid2806.212317>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Muller, D. A., & Young, P. R. (2013). The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.*, 98(2), 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>
- Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2007). Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.*, 117(5), 1147–1154. <https://doi.org/10.1172/JCI31178>

- Murray, C. L., Jones, C. T., & Rice, C. M. (2008). Architects of assembly: Roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(9), 699–708. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1928>
- Murray, K. O., Gorchakov, R., Carlson, A. R., Berry, R., Lai, L., Natrajan, M., Garcia, M. N., Correa, A., Patel, S. M., Aagaard, K., & Mulligan, M. J. (2017). Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood. *Emerg. Infect. Dis.*, 23(1), 99–101. <https://doi.org/10.3201/eid2301.161394>
- Narvaez, F., Gutierrez, G., Pérez, M. A., Elizondo, D., Nuñez, A., Balmaseda, A., & Harris, E. (2011). Evaluation of the Traditional and Revised WHO Classifications of Dengue Disease Severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 5(11), e1397. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001397>
- Nicholson, A., Rait, G., Murray-Thomas, T., Hughes, G., Mercer, C. H., & Cassell, J. (2010). Management of epididymo-orchitis in primary care: results from a large UK primary care database. *Brit. J. Gen. Pract.*, 60(579), e407–e422. <https://doi.org/10.3399/bjgp10X532413>
- Nickel, J. C., Siemens, D. R., Nickel, K. R., & Downey, J. (2002). The Patient With Chronic Epididymitis: Characterization Of An Enigmatic Syndrome. *J. Urol.*, 167(4), 1701–1704. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)65181-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)65181-6)
- O'Hara, L., Welsh, M., Saunders, P. T. K., & Smith, L. B. (2011). Androgen receptor expression in the caput epididymal epithelium is essential for development of the initial segment and epididymal spermatozoa transit. *Endocrinology*, 152(2), 718–729. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0928>
- Palladino, M. A., Johnson, T. A., Gupta, R., Chapman, J. L., & Ojha, P. (2007). Members of the toll-like receptor family of innate immunity pattern-recognition receptors are abundant in the male rat reproductive tract. *Biol. Reprod.*, 76(6), 958–964. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059410>
- Pallotta, M. T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Biciato, S., Mazza, E. M. C., Boon, L., Grassi, F., Fioretti, M. C., Fallarino, F., Puccetti, P., & Grohmann, U. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat. Immunol.*, 12(9), 870–878. <https://doi.org/10.1038/ni.2077>
- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H., & Lee, J. O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458(7242), 1191–1195. <https://doi.org/10.1038/nature07830>
- Patrão, M. T. C. C., Silva, E. J. R., & Avellar, M. C. W. (2009). Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 53, 934–945. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000800006>
- Patterson, J., Sammon, M., & Garg, M. (2016). Dengue, zika and chikungunya: Emerging arboviruses in the new world. *West. J. Emerg. Med.*, 17(6), 671–679. <https://doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904>
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2018). The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature*, 560(7720), 573–581. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0446-y>
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat. Microbiol.*, 5(6), 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Pierucci-Alves, F., Midura-Kiela, M. T., Fleming, S. D., Schultz, B. D., & Kiela, P. R. (2018). Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dendritic Cells Is Required for Immunotolerance to Sperm in the Epididymis. *Front. Immunol.*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01882>
- Pilatz, A., Hossain, H., Kaiser, R., Mankertz, A., Schüttler, C. G., Domann, E., Schuppe, H. C., Chakraborty, T., Weidner, W., & Wagenlehner, F. (2015). Acute Epididymitis Revisited: Impact of

Molecular Diagnostics on Etiology and Contemporary Guideline Recommendations. *Euro. Urol.*, 68(3), 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.12.005>

Pleuger, C., Ai, D., Hoppe, M. L., Winter, L. T., Bohnert, D., Karl, D., Guenther, S., Epelman, S., Kantores, C., Fijak, M., Ravens, S., Middendorff, R., Mayer, J. U., Loveland, K. L., Hedger, M., Bhushan, S., & Meinhardt, A. (2022). The regional distribution of resident immune cells shapes distinct immunological environments along the murine epididymis. *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.82193>

Pleuger, C., Silva, E. J. R., Pilatz, A., Bhushan, S., & Meinhardt, A. (2020). Differential Immune Response to Infection and Acute Inflammation Along the Epididymis. *Front. Immunol.*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599594>

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M., Huffel, C., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., & Beutler, B. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science*, 282. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2085>

Póvoa, T. F., Oliveira, E. R. A., Basílio-de-Oliveira, Carlos. A., Nuovo, G. J., Chagas, V. L. A., Salomão, N. G., Mota, E. M., & Paes, M. V. (2016). Peripheral Organs of Dengue Fatal Cases Present Strong Pro-Inflammatory Response with Participation of IFN-Gamma-, TNF-Alpha- and RANTES-Producing Cells. *PLOS ONE*, 11(12), e0168973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168973>

Punzel, M., Korukluoğlu, G., Caglayik D.Y., & et. al. (2014). Dengue virus transmission by blood stem cell donor after travel to Sri Lanka; Germany, 2013. *Emerg. Infect. Dis.*, 20, 1366. <https://doi.org/10.3201%2Fcid2008.140508>

Quintar, A. A., Roth, F. D., De Paul, A. L., Aoki, A., & Maldonado, C. A. (2006). Toll-like receptor 4 in rat prostate: Modulation by testosterone and acute bacterial infection in epithelial and stromal cells. *Biol. Reprod.*, 75(5), 664–672. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053967>

Reiner, R. C., Stoddard, S. T., Forshey, B. M., & et al. (2014). Time-varying, serotype-specific force of infection of dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, E2694–E2702. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314933111>

Robaire, B., & Hinton, B. T. (2006). The epididymis. Em *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (p. 1071–1148). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50027-0>

Robinson, P. J. (1997). Signal Transduction Via GPI-Anchored Membrane Proteins. Em *ADP-Ribosylation in Animal Tissues. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 419). Springer.

Rodrigues, A., Queiróz, D. B. C., Honda, L., Silva, E. J. R., Hall, S. H., & Avellar, M. C. W. (2008). Activation of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) by in vivo and in vitro exposure of rat epididymis to lipopolysaccharide from Escherichia coli. *Biol. Reprod.*, 79(6), 1135–1147. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069930>

Rothman, A. L. (2011). Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat. Rev. Immunol.*, 11, 532–543. <https://doi.org/10.1038/nri3014>

Rusz, A., Pilatz, A., Wagenlehner, F., Linn, T., Diemer, Th., Schuppe, H. C., Lohmeyer, J., Hossain, H., & Weidner, W. (2012). Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. *World J. Clin. Urol.*, 30(1), 23–30. <https://doi.org/10.1007/s00345-011-0726-8>

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.-D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., & Tsukita, S. (2000). Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Mol. Biol. Cell*, 11(12), 4131–4142. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4131>

- Salam, A. P., & Horby, P. W. (2017). The Breadth of Viruses in Human Semen. *Emerg. Infect. Dis.*, 23(11), 1922–1924. <https://doi.org/10.3201/eid2311.171049>
- Schröder, M., & Bowie, A. G. (2005). TLR3 in antiviral immunity: Key player or bystander? *Trends Immunol.*, 26(9), 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.07.002>
- Serre, V., & Robaire, B. (1999). Distribution of Immune Cells in the Epididymis of the Aging Brown Norway Rat Is Segment-Specific and Related to the Luminal Content 1. *Biol. Reprod.*, 61, 705–714. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/61/3/705/2734632>
- Shen, L., Shan, X., Hu, P., Zhang, Y., Ji, Z., Ni, L., Yuan, Y., Zheng, H., Wang, T., & Yu, Q. (2021). In vitro and in vivo evaluation of virus-induced innate immunity in mouse. *STAR Protocols*, 2(3), 100708. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100708>
- Sheng, Z., Gao, N., Fan, D., Wu, N., Zhang, Y., Han, D., Zhang, Y., Tan, W., Wang, P., & An, J. (2021). Zika virus disrupts the barrier structure and absorption/secretion functions of the epididymis in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 15(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009211>
- Shi, Y., & Gao, G. F. (2017). Structural Biology of the Zika Virus. *Trends Biochem. Sci.*, 42(6), 443–456. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.009>
- Shum, W. W. C., Ruan, Y. C., Da Silva, N., & Breton, S. (2011). Establishment of Cell-Cell Cross Talk in the Epididymis: Control of Luminal Acidification. *J. Androl.*, 32(6), 576–586. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.012971>
- Shum, W. W., Smith, T. B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L. S., Roy, J. W., Hill, E., Pittet, M. J., Breton, S., & Da Silva, N. (2014). Epithelial Basal Cells Are Distinct from Dendritic Cells and Macrophages in the Mouse Epididymis1. *Biol. Reprod.*, 90(5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116681>
- Silva, E. J. R., Ribeiro, C. M., Mirim, A. F. M., Silva, A. A. S., Romano, R. M., Hallak, J., & Avellar, M. C. W. (2018). Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid differentially modulate epididymal cytokine and chemokine profiles and sperm parameters in experimental acute epididymitis. *Sci. Rep.*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17944-4>
- Silvennoinen, O., Ihle, J. N., Schlessing, J., & Levy, D. E. (1993). Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature*, 366. <https://doi.org/10.1038/366583a0>
- Simmons, C. P., Farrar, J. J., van Vinh Chau, N., & Wills, B. (2012). Dengue. *NEJM*, 366. <https://doi.org/10.1056/nejmra1110265>
- Sipilä, P., & Björkgren, I. (2016). Segment-specific regulation of epididymal gene expression. *Reproduction*, 152(3), R91–R99. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0533>
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J. Infect. Dis.*, 216, 935–944. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix515>
- Sullivan, R., & Miesusset, R. (2016). The human epididymis: Its function in sperm maturation. *Hum. Reprod. Update*, 22(5), 574–587. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>
- Sun, D. S., King, C. C., Huang, Y. L., Shih, C. C., Lee, C., Tsai, W. J., Yu, C., & Chang, H. (2007). Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J. Thromb. Haemost.*, 5, 2291–2299. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02754.x>
- Takeda, K., & Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.*, 16(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003>
- Takeichi, M. (2007). The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8(1), 11–20. <https://doi.org/10.1038/nrn2043>

- Tambyah, P. A., Koay, E. S., Poon, M. L., Lin, R. V., & Ong, B. K. (2008). Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *NEJM*, 359, 1526–1527. <https://doi.org/10.1056/nejmc0708673>
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S. C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E. M., Christian, K. M., Didier, R. A., Jin, P., Song, H., & Ming, G. L. (2016). Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell*, 18(5), 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>
- Taylor, S. N. (2015). Epididymitis. *Clin. Infect. Dis.*, 61(suppl 8), S770–S773. <https://doi.org/10.1093/cid/civ812>
- Thurmond, S., Wang, B., Song, J., & Hai, R. (2018). Suppression of type I interferon signaling by flavivirus NS5. *Viruses*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/v10120712>
- Tijssen, P. (1985). Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Em P. (Ed.) Tijssen (Org.), *Conjugation of Haptens* (p. 279–296). Elsevier.
- Tracy, C. R., Steers, W. D., & Costabile, R. (2008). Diagnosis and Management of Epididymitis. *Urol. Clin. North Am.*, 35(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2007.09.013>
- Tsetsarkin, K. A., Maximova, O. A., Liu, G., Kenney, H., Teterina, N., Bloom, M. E., Grabowski, J. M., Mlera, L., Nagata, B. M., Moore, I., Martens, C., Amaro-Carambot, E., Lamirande, E. W., Whitehead, S. S., & Pletnev, A. G. (2018). Routes of Zika virus dissemination in the testis and epididymis of immunodeficient mice. *Nat. Commun.*, 9(1), 5350. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07782-x>
- Turner, T. T. (2008). De Graaf's thread: The human epididymis. *J. Androl.*, 29(3), 237–250. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004119>
- Ubol, S., & Halstead, S. B. (2010). How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. *Clin. Vaccine Immunol.*, 17(12), 1829–1835. <https://doi.org/10.1128/CVI.00316-10>
- Ubol, S., Phuklia, W., Kalayanarooj, S., & Modhiran, N. (2010). Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. *J. Infect. Dis.*, 201(6), 923–935. <https://doi.org/10.1086/651018>
- Uraki, R., Hwang, J., Jurado, K. A., Householder, S., Yockey, L. J., Hastings, A. K., Homer, R. J., Iwasaki, A., & Fikrig, E. (2017). Zika virus causes testicular atrophy. *Sci. Adv.*, 3(2). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602899>
- Van Itallie, C., & Anderson, J. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 403–429. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404>
- Voisin, A., Saez, F., Drevet, J., & Guiton, R. (2019). The epididymal immune balance: A key to preserving male fertility. *Asian J. Androl.*, 21(6), 531–539. https://doi.org/10.4103/aja.aja_11_19
- Voisin, A., Whitfield, M., Damon-Soubeyrand, C., Goubely, C., Henry-Berger, J., Saez, F., Kocer, A., Drevet, J. R., & Guiton, R. (2018). Comprehensive overview of murine epididymal mononuclear phagocytes and lymphocytes: Unexpected populations arise. *J. Reprod. Immunol.*, 126, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.01.003>
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A. D. T., Watowich, S. J., Gubler, D. J., & Weaver, S. C. (2000). Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *J. Virol.*, 74(7), 3227–3234. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3227-3234.2000>
- Wang, S., He, R., & Anderson, R. (1999). PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J. Virol.*, 73(3), 2547–2551. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.3.2547-2551.1999>

- Watterson, D., Modhiran, N., & Young, P. R. (2016). The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Res.*, 130, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.02.014>
- Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., Shi, P. Y., & Vasilakis, N. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res.*, 130, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010>
- Wei, Z., Sun, X., Xu, Q., Zhang, Y., Tian, F., Sun, H., Zheng, H., & Dai, J. (2016). TAK-242 suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in human coronary artery endothelial cells. *Pharmazie*, 71(10), 583–587. <https://doi.org/10.1691/ph.2016.6512>
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host. & Microbe.*, 5(4), 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- Wijayarathna, R., Genovese, R., Meinhardt, A., Loveland, K. L., Groome, N. P., Hinton, B. T., & Hedger, M. P. (2022). Examination of testicular lumicrine regulation of activins and immunoregulatory genes in the epididymal caput. *Andrology*, 10(1), 190–201. <https://doi.org/10.1111/andr.13099>
- Wijayarathna, R., Pasalic, A., Nicolas, N., Biniwale, S., Ravinthiran, R., Genovese, R., Muir, J. A., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Fijak, M., & Hedger, M. P. (2020). Region-specific immune responses to autoimmune epididymitis in the murine reproductive tract. *Cell Tissue Res.*, 381(2), 351–360. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03215-8>
- Yach, D. (2005). Globalization and Health: Exploring the opportunities and constraints for health arising from globalization. *Glob. Health*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1744-8603-1-2>
- Yakirevich, E. (2002). Cytotoxic phenotype of intra-epithelial lymphocytes in normal and cryptorchid human testicular excurrent ducts. *Hum. Reprod.*, 17(2), 275–283. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.2.275>
- Yeung, C. H., Nashan, D., Sorg, C., Oberpenning, F., Schulze, H., Nieschlag, E., & Cooper, T. G. (1994). Basal Cells of the Human Epididymis—Antigenic and Ultrastructural Similarities to Tissue-Fixed Macrophages1. *Biol. Reprod.*, 50(4), 917–926. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.4.917>
- Youn, S., Li, T., McCune, B. T., Edeling, M. A., Fremont, D. H., Cristea, I. M., & Diamond, M. S. (2012). Evidence for a Genetic and Physical Interaction between Nonstructural Proteins NS1 and NS4B That Modulates Replication of West Nile Virus. *J. Virol.*, 86(13), 7360–7371. <https://doi.org/10.1128/jvi.00157-12>
- Young, P. R. (2018). Arboviruses: A Family on the Move. Em R. Hilgenfeld & S. Vasudevan (Orgs.), *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*. (Springer). https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_1
- Young, P. R., Hilditch, P. A., Bletchly, C., & Halloran, W. (2000). An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. *J. Clin. Microbiol.*, 38(3), 1053–1057. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1053-1057.2000>
- Zhang, X., Jia, R., Shen, H., Wang, M., Yin, Z., & Cheng, A. (2017). Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. *Viruses*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/v9110338>
- Zhao, Y.-T., Guo, J.-H., Wu, Z.-L., Xiong, Y., & Zhou, W.-L. (2008). Innate immune responses of epididymal epithelial cells to Staphylococcus aureus infection. *Immunol. Lett.*, 119(1–2), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.05.002>

- Zheng, Y., Liu, Q., Wu, Y., Ma, L., Zhang, Z., Liu, T., Jin, S., She, Y., Li, Y., & Cui, J. (2018). Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS 1-caspase-1 axis . *EMBO J.*, 37(18). <https://doi.org/10.15252/embj.201899347>
- Zhu, W., Zhao, S., Liu, Z., Cheng, L., Wang, Q., Yan, K., Chen, Q., Wu, H., & Han, D. (2015). Pattern Recognition Receptor–Initiated Innate Antiviral Responses in Mouse Epididymal Epithelial Cells. *J. Immunol.*, 194(10), 4825–4835. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402706>
- Zou, J., Xie, X., Wang, Q.-Y., Dong, H., Lee, M. Y., Kang, C., Yuan, Z., & Shi, P.-Y. (2015). Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. *J. Virol.*, 89(7), 3455–3470. <https://doi.org/10.1128/jvi.03453-14>

Material Suplementar

Materiais suplementares para:

Perfil de expressão de genes envolvidos no processo inflamatório do epidídimo de camundongos induzido pelas proteínas NS1-ZIKV e NS1-DENV, e o papel do receptor *Toll-like 4* na resposta inflamatória.

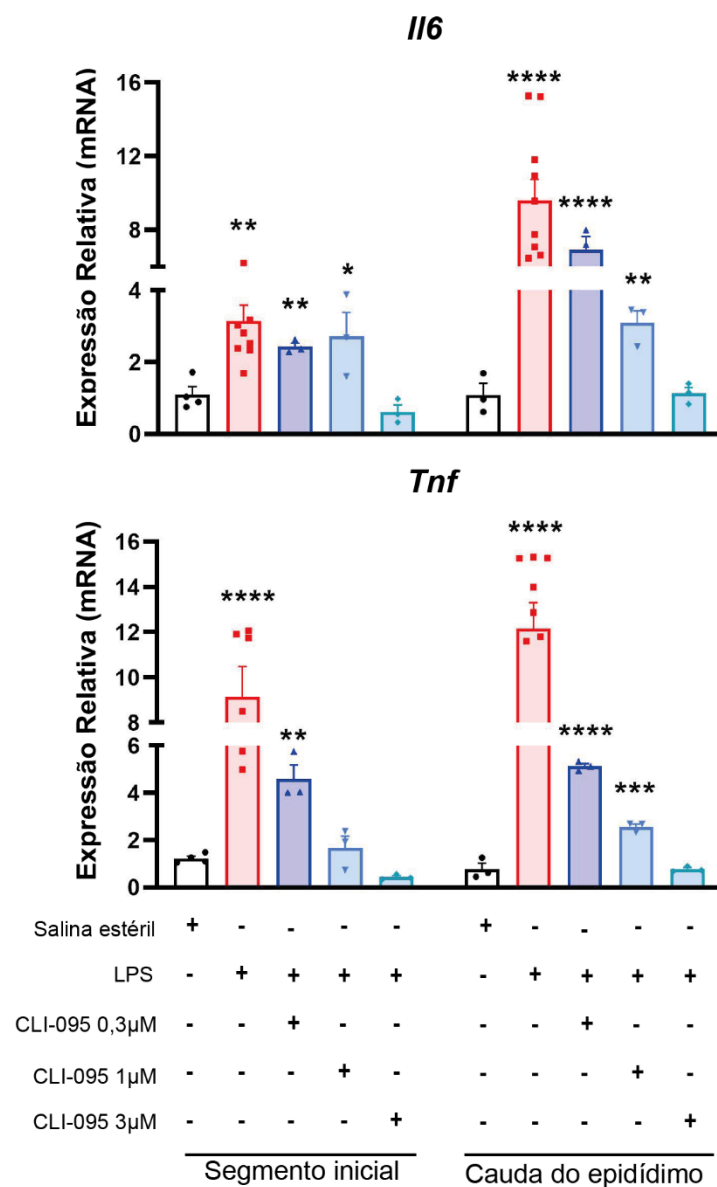
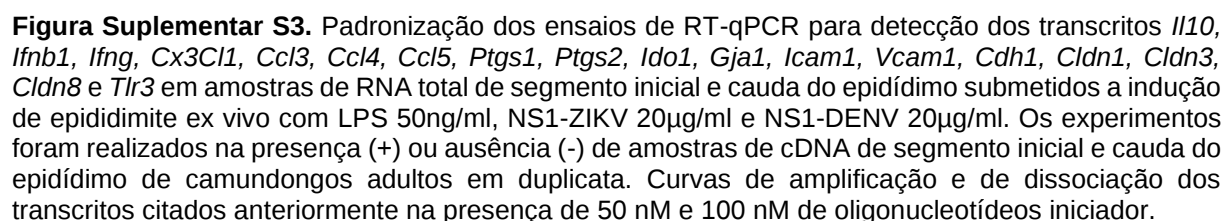


Figura Suplementar S1. Padronização inibidor de via TLR4 CLI-095. Expressão relativa dos genes *Il6* e *Tnf* no segmento inicial e cauda do epidídimo de camundongos submetidos ao pré-tratamento de 1 h com inibidor de via TLR4 CLI-095 em três diferentes concentrações (0.3, 1 e 3 µM), seguido de tratamento por 3 h com LPS (50 ng/ml). Os valores foram normalizados utilizando o transcrito *Hprt1* como controle endógeno e expressos em relação à quantidade de mRNA determinada no grupo controle salina estéril. Os valores foram expressos como média ± SEM n= 3-9 / grupo. Quantidade de asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (*p < 0,05; **p < 0,005; ****p < 0,0001; One-way ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni).

Tabela Suplementar S2. Perfil de expressão relativa (mRNA) de genes pró-inflamatórios (*Il6* e *Tnf*) no segmento inicial e cauda do epidídimo após inibição de via TLR4 utilizando o inibidor CLI-095

Expressão Relativa (mRNA)	Segmento Inicial					Cauda				
	Salina estéril n = 6	LPS 50ng/ml n = 8	LPS + CLI-095 0,3µM n = 4	LPS + CLI-095 1µM n = 4	LPS + CLI-095 3µM n = 4	Salina estéril n = 3	LPS 50ng/ml n = 9	LPS + CLI-095 0,3µM n = 3	LPS + CLI-095 1µM n = 3	LPS + CLI-095 3µM n = 3
<i>Il6</i>	1,09 ± 0,21	3,14 ± 0,66 p=0,0013	2,42 ± 0,09 p=0,0424	2,72 ± 0,56 p=0,0287	0,61 ± 0,16 p>0,9999	1,08 ± 0,27	9,60 ± 2,04 p<0,0001	6,90 ± 0,63 p<0,0001	3,08 ± 0,28 p=0,0043	1,13 ± 0,14 p>0,9999
<i>Tnf</i>	1,22 ± 0,09	9,16 ± 1,31 p<0,0001	4,60 ± 0,57 p=0,0012	1,55 ± 0,48 p>0,9999	1,24 ± 0,06 p>0,9999	0,77 ± 0,21	12,16 ± 1,7 p<0,0001	5,13 ± 0,09 p<0,0001	2,57 ± 0,1 p=0,0006	0,76 ± 0,05 p>0,9999

Os dados representam a média ± SEM de experimentos realizados com amostras do n experimental de camundongos indicados. Os asteriscos indicam que são estatisticamente diferentes do respectivo grupo controle salina estéril (One-way ANOVA, p<0,05).



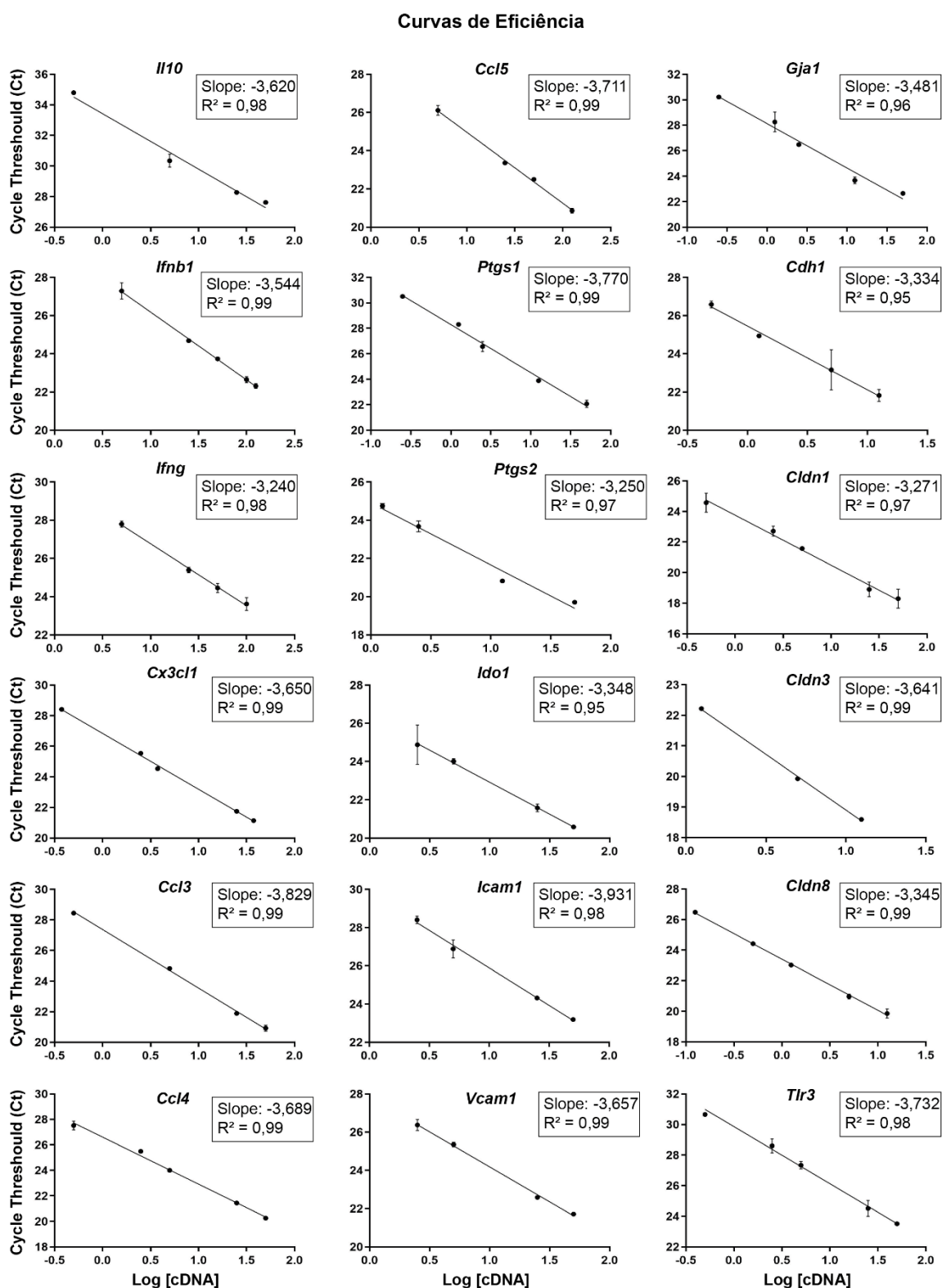


Figura Suplementar S4. Padronização dos ensaios de RT-qPCR para detecção dos transcritos *Il10*, *Ifnb1*, *Ifng*, *Cx3cl1*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ptgs1*, *Ptgs2*, *Ido1*, *Gja1*, *Icam1*, *Vcam1*, *Cdh1*, *Cldn1*, *Cldn3*, *Cldn8* e *Tlr3* em amostras de RNA total de segmento inicial e cauda do epidídimo submetidos a indução de epididimite ex vivo com LPS 50ng/ml, NS1-ZIKV 20µg/ml e NS1-DENV 20µg/ml. Os experimentos foram realizados na presença (+) ou ausência (-) de amostras de cDNA de segmento inicial e cauda do epidídimo de camundongos adultos em duplicata. Curvas de eficiência dos transcritos citados anteriormente na presença de 50 nM e 100nM de oligonucleotídeos iniciador.

Tabela Suplementar S5. Perfil de expressão relativa (mRNA) de genes pró-inflamatórios (*Il6* e *Tnf*) no segmento inicial do epidídimo frente ao estímulo inflamatório durante 3 h por LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV.

Expressão Relativa (mRNA)	Segmento Inicial							
	Salina estéril n = 6	LPS 50ng/ml n = 8	NS1-ZIKV 1µg/ml n = 4	NS1-ZIKV 10µg/ml n = 4	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 1µg/ml n = 4	NS1-DENV 10µg/ml n = 5	NS1-DENV 20µg/ml n = 4
<i>Il6</i>	1,02 ± 0,19	2,94 ± 0,75 p<0,0001	0,79 ± 0,07 p>0,9999	1,29 ± 0,26 p>0,9999	1,98 ± 0,43 p=0,0958	1,57 ± 0,28 p=0,5755	1,63 ± 0,4 p=0,5722	1,76 ± 0,18 p=0,1632
<i>Tnf</i>	1,05 ± 0,36	3,98 ± 0,76 p=0,0068	1,23 ± 0,32 p>0,9999	3,37 ± 1,63 p=0,2320	4,72 ± 1,62 p=0,0071	3,79 ± 0,98 p=0,0250	2,31 ± 0,39 p=0,1939	4,12 ± 0,61 p=0,0075

Os dados representam a média ± SEM de experimentos realizados com amostras do n experimental de camundongos indicados. Valores de p indicam se os tratamentos são estatisticamente diferentes do respectivo grupo controle salina estéril (One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni p<0,05).

Tabela Suplementar S6. Perfil de expressão relativa (mRNA) de genes pró-inflamatórios (*Il6* e *Tnf*) no segmento inicial do epidídimo frente ao estímulo inflamatório durante 3 h por LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV.

Expressão Relativa (mRNA)	Cauda							
	Salina estéril n = 5	LPS 50ng/ml n = 9	NS1-ZIKV 1µg/ml n = 4	NS1-ZIKV 10µg/ml n = 4	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 1µg/ml n = 4	NS1-DENV 10µg/ml n = 5	NS1-DENV 20µg/ml n = 4
<i>Il6</i>	0,99 ± 0,21	4,61 ± 0,86 p<0,0001	1,60 ± 0,51 p>0,9999	2,66 ± 0,59 p=0,0103	6,26 ± 1,33 p<0,0001	3,10 ± 0,59 p=0,0083	3,67 ± 0,86 p=0,0026	4,47 ± 0,45 p=0,0003
<i>Tnf</i>	0,92 ± 0,13	2,05 ± 0,35 p=0,0025	2,93 ± 0,68 p=0,0003	2,9 ± 0,64 p=0,0004	4,5 ± 0,75 p<0,0001	1,91 ± 0,16 p=0,0217	2,77 ± 0,65 p=0,0003	2,78 ± 0,47 p=0,0004

Os dados representam a média ± SEM de experimentos realizados com amostras do n experimental de camundongos indicados. Valores de p indicam se os tratamentos são estatisticamente diferentes do respectivo grupo controle salina estéril (One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni p<0,05).

Tabela Suplementar S7. Perfil de expressão relativa (mRNA) de citocinas, quimiocinas e interferons no segmento inicial e cauda do epidídimo frente ao estímulo inflamatório durante 3 h por LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV

Expressão Relativa (mRNA)	Segmento Inicial				Cauda do epidídimo			
	Salina estéril n = 5	LPS 50ng/ml n = 9	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 20µg/ml n = 5	Salina estéril n = 5	LPS 50ng/ml n = 9	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 20µg/ml n = 5
<i>Il10</i>	0,92 ± 0,29	5,46 ± 1,47 p = 0,0394	7,06 ± 0,73 p = 0,0162	3,39 ± 1,01 p = 0,5844	1,08 ± 0,2	6,3 ± 1,07 p = 0,0020	7,09 ± 1,16 p = 0,0028	9,12 ± 1,11 p<0,0001
<i>Ifnb1</i>	1,01 ± 0,27	10,62 ± 2,31 p = 0,0087	9,25 ± 1,94 p = 0,0745	13,4 ± 1,56 p = 0,0030	1,13 ± 0,22	19,01 ± 2,73 p<0,0001	25,1 ± 2,52 p<0,0001	33,04 ± 2,38 p<0,0001
<i>Ifng</i>	1,05 ± 0,28	15 ± 1,95 p<0,0001	4,42 ± 0,56 p = 0,0033	3,68 ± 1,15 p = 0,0137	0,97 ± 0,17	17,71 ± 4,33 p<0,0001	11,76 ± 1,79 p = 0,0002	11,1 ± 0,94 p = 0,0001
<i>Ccl2</i>	0,82 ± 0,11	2,86 ± 0,36 p<0,0001	0,79 ± 0,13 p>0,9999	0,46 ± 0,09 p = 0,1776	1 ± 0,11	3,06 ± 0,39 p = 0,0002	1,17 ± 0,29 p>0,9999	1,54 ± 0,27 p = 0,3240
<i>Ccl3</i>	0,89 ± 0,18	7,33 ± 1,49 p<0,0001	5,15 ± 1,58 p = 0,0016	4,67 ± 1,17 p = 0,0017	1,08 ± 0,2	5,57 ± 1,1 p<0,0001	5,71 ± 0,92 p = 0,0001	6,97 ± 1,39 p<0,0001
<i>Ccl4</i>	0,99 ± 0,32	6,19 ± 1,06 p = 0,0014	2,19 ± 0,35 p>0,9999	3,21 ± 0,64 p = 0,3873	1,08 ± 0,21	5,99 ± 0,82 p = 0,0002	5,37 ± 0,9 p = 0,0047	4,08 ± 0,77 p = 0,0388
<i>Ccl5</i>	0,6 ± 0,14	3,11 ± 0,43 p = 0,0012	2,29 ± 0,5 p = 0,0163	2,61 ± 0,79 p = 0,0113	1,11 ± 0,19	4,52 ± 0,58 p<0,0001	2,76 ± 0,62 p = 0,0126	5,63 ± 0,49 p<0,0001
<i>Cxcl2</i>	0,86 ± 0,17	5,18 ± 0,76 p<0,0001	2,09 ± 0,33 p = 0,0250	2,04 ± 0,75 p = 0,0607	1,03 ± 0,2	10,18 ± 1,25 p<0,0001	3,71 ± 0,98 p = 0,0040	6,81 ± 1,55 p<0,0001
<i>Cx3cl1</i>	0,98 ± 0,16	0,76 ± 0,12 p = 0,4430	1,04 ± 0,1 p>0,9999	0,87 ± 0,1 p>0,9999	0,88 ± 0,14	0,51 ± 0,04 p = 0,0405	0,81 ± 0,04 p>0,9999	0,78 ± 0,12 p>0,9999

Os dados representam a média ± SEM de experimentos realizados com amostras do n experimental de camundongos indicados. Valores de p indicam se os tratamentos são estatisticamente diferentes do respectivo grupo controle salina estéril (One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni p<0,05).

Tabela Suplementar S8. Concentração de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e interferons) secretados em meio de cultura organotípica durante 3 h frente ao estímulo inflamatório por LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV.

Concentração de proteína total (pg/μg)	Segmento Inicial				Cauda do epidídimo			
	Salina estéril n = 3	LPS 50ng/ml n = 5	NS1-ZIKV 20μg/ml n = 4	NS1-DENV 20μg/ml n = 5	Salina estéril n = 3	LPS 50ng/ml n = 5	NS1-ZIKV 20μg/ml n = 4	NS1-DENV 20μg/ml n = 4
TNF	0,66 ± 0,12	2,40 ± 0,64 p=0,0806	0,88 ± 0,43 p=0,9803	1,21 ± 0,36 p=0,7744	0,24 ± 0,08	0,26 ± 0,04 p=0,9699	0,43 ± 0,1 p=0,4209	0,67 ± 0,27 p=0,2524
MCP-1 (Ccl2)	135,3 ± 11,35	291,3 ± 99,41 p=0,3045	90,19 ± 52,67 p=0,9415	109,7 ± 30,38 p=0,9862	23,94 ± 6,13	25,9 ± 7,55 p=0,9999	40,87 ± 8,66 p=0,6436	70,06 ± 29,42 p=0,3069
IL1B	38,67 ± 14,77	56,53 ± 12,5 p=0,5762	15,88 ± 8,32 p=0,4352	24,99 ± 9,44 p=0,7387	4,83 ± 1,58	5,98 ± 1,61 p=0,9749	5,44 ± 1,25 p=0,9860	14,38 ± 6,41 p=0,4445
MIP-2α (Cxcl2)	-	-	-	-	-	-	-	-
IL6	115,3 ± 34,19	219,2 ± 73,59 p=0,4952	94,85 ± 48,38 p=0,9892	143,9 ± 53,15 p=0,9686	40,49 ± 18,42	33,97 ± 9,59 p=0,9838	42,06 ± 2,25 p=0,9999	83,16 ± 32,85 p=0,2915
IL10	3,33 ± 0,88	5,34 ± 0,83 p=0,2885	1,94 ± 0,91 p=0,5821	2,67 ± 0,75 p=0,9035	0,59 ± 0,09	0,90 ± 0,27 p=0,9419	1,19 ± 0,24 p=0,4950	2,40 ± 1 p=0,1639
IFNG	12,00 ± 4,61	17,08 ± 3,91 p=0,6296	4,75 ± 2,4 p=0,4134	7,66 ± 2,89 p=0,7238	1,46 ± 0,51	1,78 ± 0,48 p=0,9813	1,56 ± 0,35 p=0,9946	4,20 ± 1,86 p=0,4727
MIP-1α (Ccl3)	-	-	-	-	-	-	-	-
MIP-1β (Ccl4)	54,33 ± 8,76	156,7 ± 43,3 p=0,1165	44,39 ± 28,48 p=0,9931	71,49 ± 19,99 p=0,9631	10,20 ± 1,8	16,46 ± 5,13 p=0,8945	26,39 ± 7,06 p=0,3195	50,9 ± 21,58 p=0,1060

Os dados foram normalizados em relação a concentração de proteína total (pg/μl) de meio de cultura organotípica, e representam a média ± SEM de experimentos realizados com amostras do n experimental de camundongos indicados. Analitos que não possuem dados estatísticos extrapolaram na quantificação (One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, p<0,05)

Tabela Suplementar S9. Perfil de expressão relativa (mRNA) de enzimas e moléculas de adesão envolvidas no processo regulação da resposta inflamatória e imunológica no segmento inicial e cauda do epidídimo frente ao estímulo inflamatório por LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV

Expressão Relativa (mRNA)	Segmento Inicial				Cauda do epidídimo			
	Salina estéril n = 5	LPS 50ng/ml n = 9	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 20µg/ml n = 5	Salina estéril n = 5	LPS 50ng/ml n = 9	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 20µg/ml n = 5
<i>Ptgs1</i>	0,99 ± 0,17	0,88 ± 0,06 p>0,9999	1,18 ± 0,11 p = 0,9537	0,81 ± 0,14 p = 0,8701	0,87 ± 0,07	0,52 ± 0,05 p = 0,0017	0,77 ± 0,06 p>0,9999	0,66 ± 0,06 p = 0,2002
<i>Ptgs2</i>	1,04 ± 0,06	1,84 ± 0,24 p = 0,0435	1,87 ± 0,32 p = 0,0718	1,27 ± 0,14 p>0,9999	0,94 ± 0,1	1,50 ± 0,15 p = 0,0747	1,60 ± 0,34 p = 0,1651	1,72 ± 0,29 p = 0,0427
<i>Ido1</i>	0,86 ± 0,15	0,76 ± 0,12 p>0,9999	1,19 ± 0,24 p = 0,6142	0,85 ± 0,13 p>0,9999	1,06 ± 0,17	1,76 ± 0,37 p = 0,3126	3,36 ± 0,21 p = 0,0005	1,90 ± 0,27 p = 0,2523
<i>Icam1</i>	0,84 ± 0,19	3,08 ± 0,33 p = 0,0001	1,54 ± 0,44 p = 0,1984	1,15 ± 0,38 p>0,9999	1,1 ± 0,19	2,50 ± 0,37 p = 0,0431	2,40 ± 0,28 p = 0,0999	2,03 ± 0,92 p = 0,9903
<i>Vcam1</i>	0,74 ± 0,14	3,00 ± 0,45 p = 0,0012	1,00 ± 0,25 p>0,9999	0,95 ± 0,2 p>0,9999	1,11 ± 0,22	3,44 ± 0,55 p = 0,0020	2,82 ± 0,23 p = 0,0662	3,08 ± 0,33 p = 0,0196

Os dados representam a média ± SEM de experimentos realizados com amostras do n experimental de camundongos indicados. Valores de p indicam se os tratamentos são estatisticamente diferentes do respectivo grupo controle salina estéril (One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni p<0,05).

Tabela Suplementar S10. Perfil de expressão relativa (mRNA) moléculas envolvidas no processo de integridade e homeostasia de barreira hemato-epididimária no segmento inicial e cauda do epidídimo frente ao estímulo inflamatório durante 3 h por LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV

Expressão Relativa (mRNA)	Segmento Inicial				Cauda do epidídimo			
	Salina estéril n = 5	LPS 50ng/ml n = 9	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 20µg/ml n = 5	Salina estéril n = 5	LPS 50ng/ml n = 9	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 20µg/ml n = 5
<i>Gja1</i>	0,82 ± 0,12	0,55 ± 0,17 p = 0,1669	0,21 ± 0,04 p = 0,0297	0,21 ± 0,01 p = 0,0237	1,03 ± 0,17	0,48 ± 0,04 p = 0,0152	0,25 ± 0,07 p<0,0001	0,49 ± 0,05 p = 0,0456
<i>Cldn1</i>	0,81 ± 0,09	0,39 ± 0,09 p = 0,0164	0,14 ± 0,01 p = 0,0006	0,15 ± 0,01 p = 0,0005	1,15 ± 0,26	0,92 ± 0,16 p>0,9999	0,36 ± 0,05 p = 0,0112	0,39 ± 0,04 p = 0,0146
<i>Cldn3</i>	0,80 ± 0,06	0,52 ± 0,15 p = 0,1013	0,26 ± 0,03 p = 0,0405	0,23 ± 0,01 p = 0,0166	1,02 ± 0,15	0,52 ± 0,08 p = 0,0271	0,32 ± 0,09 p = 0,0012	0,46 ± 0,06 p = 0,0325
<i>Cldn8</i>	0,79 ± 0,05	0,49 ± 0,11 p = 0,0979	0,22 ± 0,01 p = 0,0061	0,28 ± 0,08 p = 0,0077	1,1 ± 0,12	0,60 ± 0,11 p = 0,0472	0,18 ± 0,05 p<0,0001	0,36 ± 0,04 p = 0,0045
<i>Cdh1</i>	0,84 ± 0,15	0,43 ± 0,13 p = 0,0477	0,16 ± 0,02 p = 0,0103	0,13 ± 0,01 p = 0,0027	1,07 ± 0,22	0,48 ± 0,11 p = 0,0644	0,17 ± 0,06 p = 0,0003	0,30 ± 0,05 p = 0,0152

Os dados representam a média ± SEM de experimentos realizados com amostras do n experimental de camundongos indicados. Valores de p indicam se os tratamentos são estatisticamente diferentes do respectivo grupo controle salina estéril (One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni p<0,05).

Tabela Suplementar S11. Perfil de expressão relativa (mRNA) de citocinas pró-inflamatórias no segmento inicial e cauda do epidídimo após inibição de via TLR4 utilizando o inibidor CLI-095.

Expressão Relativa (mRNA)	Segmento Inicial						
	Salina estéril n = 8	LPS 50ng/ml n = 9	LPS + CLI-095 3μM n = 5	NS1-ZIKV 20μg/ml n = 4	NS1-ZIKV + CLI-095 3μM n = 3	NS1-DENV 20μg/ml n = 5	NS1-DENV + CLI-095 3μM n = 3
<i>Il6</i>	1,02 ± 0,17	2,49 ± 0,65 p=0,0005	0,90 ± 0,29 p>0,9999	1,15 ± 0,31 p>0,9999	1,22 ± 0,08 p>0,9999	1,57 ± 0,39 p>0,9999	0,86 ± 0,02 p>0,9999
<i>Tnf</i>	1,09 ± 0,35	7,29 ± 1,68 p<0,0001	2,11 ± 0,59 p=0,2133	5,39 ± 1,78 p=0,0006	4,05 ± 0,88 p=0,0066	4,67 ± 0,93 p=0,0003	4,93 ± 1,3 p=0,0019
<i>Il1b</i>	0,85 ± 0,14	2,14 ± 0,33 p<0,0001	0,87 ± 0,29 p>0,9999	1,97 ± 0,22 p=0,0071	2,01 ± 0,21 p=0,0125	2,08 ± 0,22 p=0,0012	2,17 ± 0,25 p=0,0037
<i>Nfkb</i>	0,90 ± 0,14	1,89 ± 0,27 p=0,0109	0,75 ± 0,22 p>0,9999	0,51 ± 0,12 p=0,2092	0,90 ± 0,1 p>0,9999	0,71 ± 0,28 p=0,8785	0,85 ± 0,04 p>0,9999
Expressão Relativa (mRNA)	Cauda do epidídimo						
	Salina estéril n = 8	LPS 50ng/ml n = 8	LPS + CLI-095 3μM n = 5	NS1-ZIKV 20μg/ml n = 4	NS1-ZIKV + CLI-095 3μM n = 3	NS1-DENV 20μg/ml n = 5	NS1-DENV + CLI-095 3μM n = 3
<i>Il6</i>	1,2 ± 0,38	5,67 ± 1,3 p<0,0001	1,50 ± 0,42 p>0,9999	5,96 ± 1,3 p<0,0001	1,71 ± 0,4 p>0,9999	4,72 ± 1 p=0,0002	0,79 ± 0,22 p>0,9999
<i>Tnf</i>	1,08 ± 0,18	5,11 ± 1,08 p<0,0001	1,18 ± 0,15 p>0,9999	5,46 ± 1,23 p<0,0001	2,77 ± 0,31 p=0,2674	2,31 ± 0,25 p=0,0327	1,99 ± 0,19 p>0,9999
<i>Il1b</i>	1,07 ± 0,17	3,36 ± 0,81 p=0,0006	1,50 ± 0,27 p>0,9999	2,55 ± 0,3 p=0,1424	2,36 ± 0,27 p=0,4163	2,91 ± 0,75 p=0,0068	1,23 ± 0,28 p>0,9999
<i>Nfkb</i>	1,08 ± 0,15	2,01 ± 0,32 p=0,0014	0,90 ± 0,14 p>0,9999	0,84 ± 0,157 p>0,9999	1,49 ± 0,21 p>0,9999	1,36 ± 0,28 p>0,9999	1,23 ± 0,46 p>0,9999

Os dados representam a média ± SEM de experimentos realizados com amostras do n experimental de camundongos indicados. Valores de p indicam se os tratamentos são estatisticamente diferentes do respectivo grupo controle salina estéril (One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni p<0,05).

Tabela Suplementar S12. Perfil de expressão relativa (mRNA) de mediadores de via TLR4 no segmento inicial e cauda do epidídimo frente ao estímulo inflamatório durante 3 h por LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV.

Expressão Relativa (mRNA)	Segmento Inicial				Cauda do epidídimo			
	Salina estéril n = 5	LPS 50ng/ml n = 9	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 20µg/ml n = 5	Salina estéril n = 5	LPS 50ng/ml n = 9	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 20µg/ml n = 5
<i>Tlr4</i>	0,80 ± 0,07	1,89 ± 0,18 p = 0,0049	0,22 ± 0,01 p = 0,0005	0,51 ± 0,21 p = 0,0428	1,07 ± 0,16	2,12 ± 0,14 p = 0,0017	1,04 ± 0,17 p>0,9999	1,11 ± 0,11 p>0,9999
<i>Cd14</i>	0,81 ± 0,09	2,08 ± 0,28 p = 0,0004	0,29 ± 0,04 p = 0,0007	0,25 ± 0,01 p = 0,0002	1 ± 0,09	2,13 ± 0,15 p = 0,0016	0,67 ± 0,09 p = 0,2600	0,81 ± 0,19 p = 0,4387
<i>MyD88</i>	0,79 ± 0,05	0,83 ± 0,1 p>0,9999	0,25 ± 0,01 p<0,0001	0,25 ± 0,02 p<0,0001	0,98 ± 0,06	1,42 ± 0,14 p = 0,4404	0,27 ± 0,08 p<0,0001	0,51 ± 0,08 p = 0,0339
<i>Trif</i>	0,65 ± 0,13	3,75 ± 0,55 p<0,0001	1,01 ± 0,37 p>0,9999	0,68 ± 0,31 p>0,9999	1,04 ± 0,13	6,50 ± 0,78 p<0,0001	1,33 ± 0,26 p=0,8007	1,54 ± 0,16 p=0,1377

Os dados representam a média ± SEM de experimentos realizados com amostras do n experimental de camundongos indicados. Valores de p indicam se os tratamentos são estatisticamente diferentes do respectivo grupo controle salina estéril (One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni, p<0,05)

Tabela Suplementar S13. Perfil de expressão relativa (mRNA) do transcrito *Tlr3* no segmento inicial e cauda do epidídimo frente ao estímulo inflamatório durante 3 h por LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV.

Expressão Relativa (mRNA)	Segmento Inicial				Cauda do epidídimo			
	Salina estéril n = 5	LPS 50ng/ml n = 9	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 20µg/ml n = 5	Salina estéril n = 5	LPS 50ng/ml n = 9	NS1-ZIKV 20µg/ml n = 4	NS1-DENV 20µg/ml n = 5
<i>Tlr3</i>	0,82 ± 0,15	1,03 ± 0,13 p = 0,9609	1,50 ± 0,39 p = 0,1387	0,93 ± 0,21 p>0,9999	1,11 ± 0,22	0,88 ± 0,14 p>0,9999	1,12 ± 0,33 p>0,9999	1,35 ± 0,2 p>0,9999

Os dados representam a média ± SEM de experimentos realizados com amostras do n experimental de camundongos indicados. Valores de p indicam se os tratamentos são estatisticamente diferentes do respectivo grupo controle salina estéril (One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni, p<0,05).

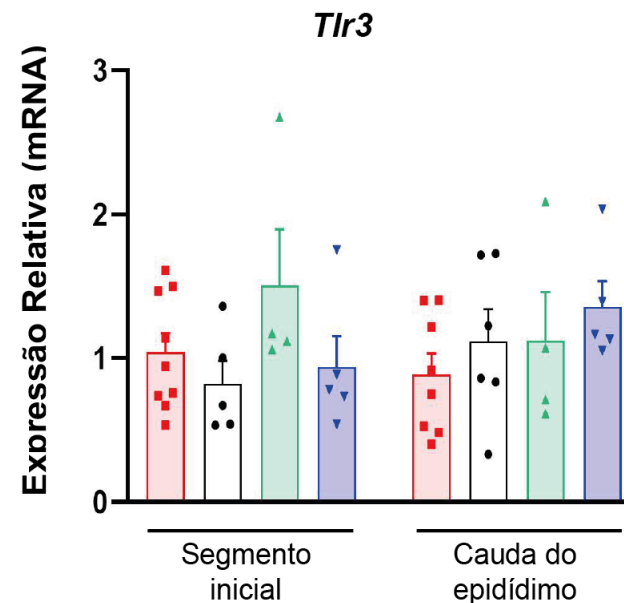


Figura Suplementar S14. Expressão relativa do transcrito *Tlr3* frente à inflamação induzida durante 3 h por LPS, NS1-ZIKV e NS1-DENV. Os valores foram normalizados utilizando o transcrito *Hprt1* como controle endógeno e expressos em relação à quantidade de mRNA determinada no grupo controle salina estéril. Os valores foram expressos como média ± SEM n= 3-9 / grupo.

Anexos

Título do Projeto: Investigação da resposta inflamatória disparada pela proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus da Zika (ZIKV) e da Dengue (DENV) em modelos experimentais de epididimite murina;

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

ANEXO I



*Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências de Botucatu*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da resposta inflamatória disparada pela proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus da Zika (ZIKV) e da Dengue (DENV) em modelos experimentais de epididimite murina.", protocolada sob o CEUA nº 2132170322 (ID 000336), sob a responsabilidade de **Erick José Ramo da Silva e equipe; Alexandre Dorth de Andrade; Isabela Andrade de Camargo; Hélio Kushima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 25/03/2022.

We certify that the proposal "Evaluation of the inflammatory response triggered by the Zika virus (ZIKV) and Dengue virus (DENV) non-structural protein 1 (NS1) in murine experimental models of epididymitis.", utilizing 168 Heterogenics mice (168 males), 36 Knockout mice (36 males), protocol number CEUA 2132170322 (ID 000336), under the responsibility of **Erick José Ramo da Silva and team; Alexandre Dorth de Andrade; Isabela Andrade de Camargo; Hélio Kushima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University (IBB/UNESP) in the meeting of 03/25/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2022 a 03/2024**

Área: **Ciências Biomédicas**

Origem: **CPPA - IBTEC/UNESP**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **90 a 120 dias**

N: **168**

Linhagem: **Mus musculus C57bl/6**

Peso: **27 a 32 g**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Camundongos Knockout**

sexo: **Machos**

idade: **90 a 120 dias**

N: **36**

Linhagem: **Mus musculus C57bl/6**

Peso: **27 a 32 kg**

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia da Reprodução e Andrologia, Departamento de Biofísica e Farmacologia, IBB/UNESP

Botucatu, 25 de março de 2022

Prof. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista

Prof. Assoc. Luis Fernando Barbisan
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista

ANEXO II



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Oswaldo Cruz
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC



LICENÇA ADITIVA
L-022/2019- A1

A Comissão CEUA/IOC, em atenção à solicitação da pesquisadora ADA MARIA DE BARCELOS ALVES, responsável pela licença (L-022/2019), do protocolo (CEUA/IOC-029/2019), intitulado "Modelos experimentais murinos para estudos com os vírus dengue e desenvolvimento de vacinas", que atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), autoriza o presente aditivo. A referida licença aditiva não exime a observância das Leis e demais exigências legais na legislação nacional.

Esta licença aditiva altera a validade de 07/09/2020 para 15/08/2024 e, exclui um membro do projeto: Amanda de Oliveira Sampaio.

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 25 de setembro de 2020.

Tânia Zaverucha do Valle
 Matrícula SIAPE 1362665
 Coordenadora da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
 Fundação Oswaldo Cruz