

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/03/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Câmpus de São José do Rio Preto

Maria Letícia Duarte Lima

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

São José do Rio Preto

2019

Maria Letícia Duarte Lima

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

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

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal

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

São José do Rio Preto

2019

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

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.

Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Maria Letícia Duarte Lima

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

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Paula Rahal

UNESP – Campus de São José do Rio Preto

Orientadora

Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior

UNESP – Campus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi

UFTM – Uberaba

São José do Rio Preto

1 de março de 2019

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

São Francisco de Assis

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

CAPÍTULO I
Considerações gerais

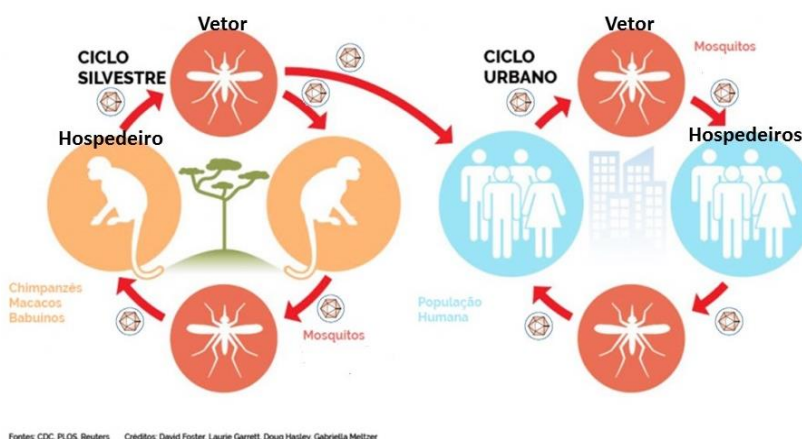
1. INTRODUÇÃO

1.1. Arbovírus

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

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

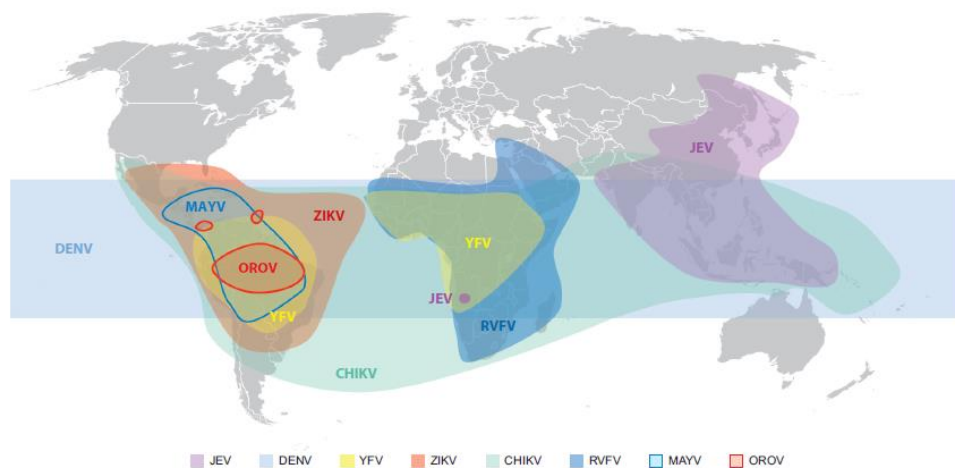
Figura 1: Exemplo de ciclo de transmissão de arbovírus em que, neste caso, o vetor é um mosquito e os hospedeiros são primatas não-humanos, no ciclo silvestre, e humanos no ciclo urbano.



Fonte: (CEARÁ) - modificado

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

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



Fonte: (WEAVER et al., 2018)

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

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

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

1.2.Ocorrência de arboviroses no Brasil

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

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

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

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

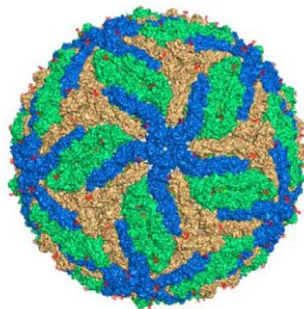
1.3. O Zika vírus

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

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

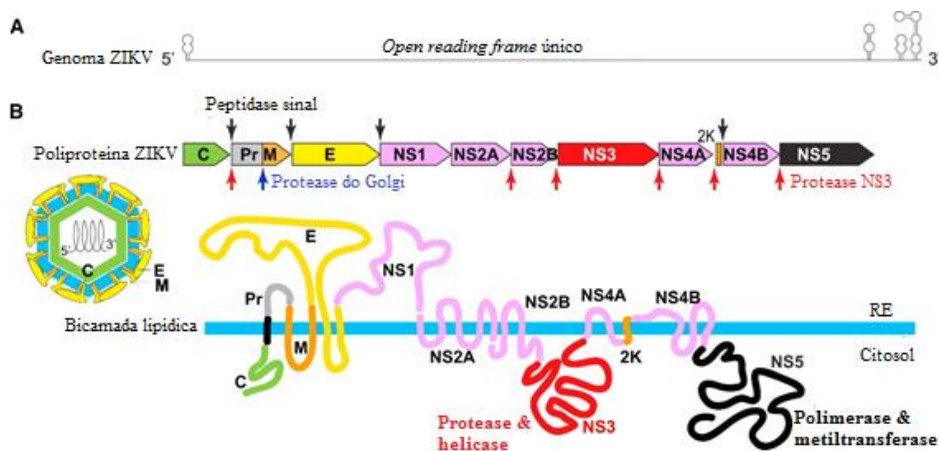
dependente de RNA (Figura 3) (CHAMBERS et al., 1990; KNIPE; HOWLEY, 2013; YE et al., 2016).

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



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

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

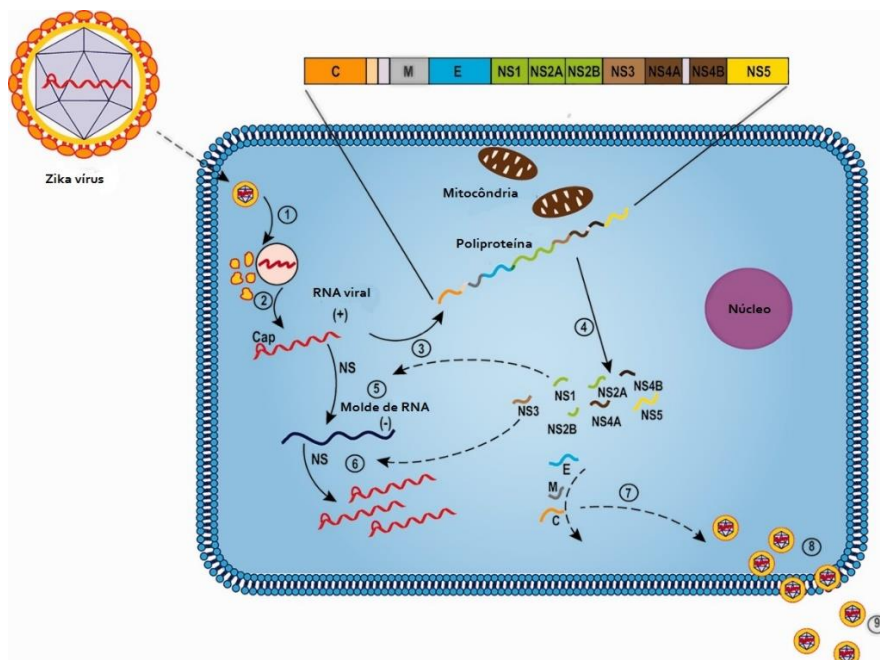


Fonte: (MING;TANG; SONG, 2016) – adaptado.

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

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

Figura 4: Ciclo replicativo de ZIKV.



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

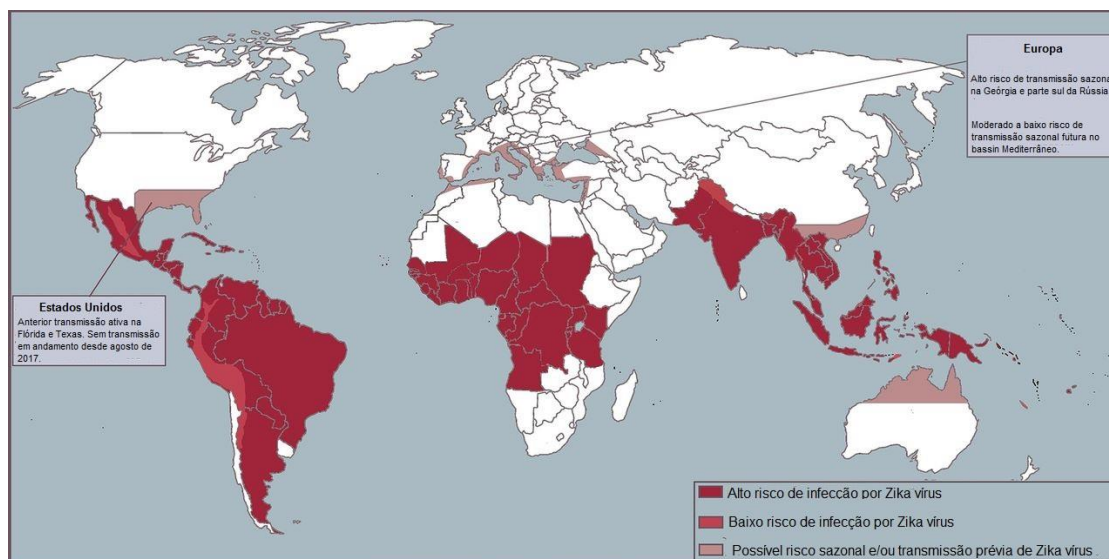
1.4. Epidemiologia

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

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

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

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



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

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

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

1.5. Sintomas e agravamentos

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

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

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

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

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

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

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

1.6. Transmissão

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.7. Modelos animais e a infecção no sistema genital masculino

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

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

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

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

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

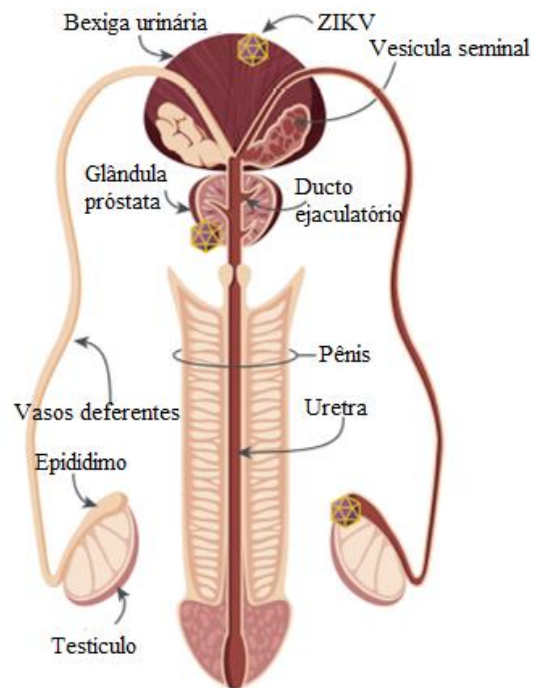
Um estudo utilizando camundongos AG129 machos, sendo alguns deles vasectomizados e outros não, infectados com ZIKV, verificou-se que os primeiros

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

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

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

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



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

6. References

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

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

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

CAPÍTULO III
Conclusão

1. CONCLUSÃO

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

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

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