

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Natália Wnuk Teixeira

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MACHOS ADULTOS NASCIDOS DE MÃES
INFECTADAS POR ZIKA VÍRUS**

Belo Horizonte

2022

Natália Wnuk Teixeira

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MACHOS ADULTOS NASCIDOS DE MÃES
INFECTADAS POR ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa

Co-orientador (a): Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski

Co-orientador (a): Dr. André Felipe de Figueiredo Almeida

Belo Horizonte

2022

043

Teixeira, Natália Wnuk.

Biologia reprodutiva de machos adultos nascidos de mães infectadas por Zika vírus [manuscrito] / Natália Wnuk Teixeira. – 2022.

77 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador(a): Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa. Co-orientadores (a): Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Dr. André Felipe de Figueiredo Almeida.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Zika vírus. 3. Flaviviridae. 4. Testículo. 5. Espermatozoides. 6. Testosterona. 7. Técnicas de Reprodução Assistida. I. Costa, Guilherme Mattos Jardim. II. Litwinski, Vivian Vasconcelos Costa. III. Almeida, André Felipe de Figueiredo. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NATÁLIA WNUK TEIXEIRA

357/2022 _ ENTRADA 1º/2020 _ 2020678335

Às **quatorze horas** do dia **31 de maio de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MACHOS ADULTOS NASCIDOS DE MÃES INFECTADAS POR ZIKA VÍRUS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa	UFMG	Aprovada
Dra. Vivian Vasconcelos Costa	UFMG	Aprovada
Dr. André Felipe de Figueiredo Almeida	UFMG	Aprovada
Dr. André Gustavo de Oliveira	UFMG	Aprovada
Dra. Mariana Machado Neves	UFV	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 31 de maio de 2022.**

Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa (Orientador)

Dr^a. Vivian Vasconcelos Costa (Coorientadora)

Dr. André Felipe de Figueiredo Almeida (Coorientador)

Dr. André Gustavo de Oliveira

Dr^a. Mariana Machado Neves

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Mattos Jardim Costa, Professor do Magistério Superior**, em 01/06/2022, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Machado Neves, Usuário Externo**, em 01/06/2022, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Felipe de Figueiredo Almeida, Usuário Externo**, em 01/06/2022, às 22:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Gustavo de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 02/06/2022, às 09:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 02/06/2022, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 02/06/2022, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1499246** e o código CRC **935861D8**.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular, do Departamento de Morfologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e orientado pelo Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa e Co-orientado pelos(as) Dr(a). Vivian Vasconcelos Costa Litwinski e André Felipe de Figueiredo Almeida. Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG e CNPq.

RESUMO

O vírus da Zika (ZIKV), pertencente à família *flaviviridae*, é transmitido principalmente pela picada do mosquito *Aedes aegypti*. O ZIKV causa uma infecção que, na maioria vezes é assintomática ou apresenta sintomas leves; entretanto, a infecção de gestantes resulta em casos de microcefalia na prole. Recentemente, nosso grupo demonstrou que murinos nascidos de mães infectadas durante a gestação apresentam redução volumétrica do túbulo seminífero, acompanhado do aumento do índice de células germinativas apoptóticas e decréscimo do índice meiótico e da eficiência de células de Sertoli. Neste contexto, o presente estudo objetivou investigar a presença de proteínas virais e detalhar as causas das alterações testiculares em camundongos nascidos de mães infectadas por ZIKV durante a gestação. Foram criados dois grupos experimentais em que camundongas gestantes (no dia 5,5 pós-coito) foram expostas a PBS e a carga viral de ZIKV (10^6 Unidades Formadoras de Placa). Doze semanas após o nascimento da prole, foram investigadas as proteínas virais nas gônadas e realizadas análises biométricas, testiculares, hormonais e nos gametas. Interessantemente, a prole exposta ao ZIKV apresentou a proteína NS1 em diferentes células testiculares (principalmente em células de Leydig, células de Sertoli e germinativas). A prole infectada apresentou menor peso testicular e índice anogenital, o que é condizente com a drástica redução da via esteroidogênia testicular, comprometendo a concentração plasmática e intratesticular de testosterona. Além disso, podemos mencionar a falha na sinalização das células de Leydig com células de Sertoli e com macrófagos. Observamos falhas na fase de diferenciação espermática (que é altamente depende de andrógenos), e, como consequência, identificamos defeitos de cabeça, falhas de protaminação, maior fragmentação do DNA e mudanças das propriedades dielétricas dos espermatozoides. No presente estudo, ainda demonstramos que as propriedades dielétricas do espermatozoide, associadas com modelagem de inteligência artificial, são promissoras para o estabelecimento de um teste rápido diagnóstico de alterações espermáticas decorrentes de infecção viral. Os resultados obtidos trazem um importante alerta para potenciais problemas de fertilidade em indivíduos que tenham nascidos de mães infectadas por ZIKV durante a gestação.

Palavras-chave: *Flaviviridae*; Prole; Testículo; Espermatozoide; Testosterona; Reprodução Assistida.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV), belonging to the *Flaviviridae* family, is transmitted primarily by the bite of the *Aedes aegypti* mosquito. ZIKV causes an infection that is primarily asymptomatic or presents mild symptoms; however, infection of pregnant women results in cases of microcephaly in the offspring. Recently, our research group demonstrated that murine infants born from mothers infected during pregnancy present substantial testicular alterations. In this context, the present study aimed to investigate the presence of viral proteins and detail the causes of testicular alterations in mice born from mothers infected with ZIKV during gestation. Two experimental groups were created in which pregnant mice (at day 5.5 post-coitus) were exposed to PBS and ZIKV viral load (10⁶ Plaque Forming Units). Twelve weeks after the offspring were born, viral proteins were investigated in the gonads, and biometric, testicular, hormonal, and gamete analyses were performed. Interestingly, ZIKV-exposed offspring showed NS1 protein in different testicular cells (mainly Leydig cells, Sertoli cells, and germ cells). The infected offspring showed lower testicular weight and anogenital index, consistent with the drastic reduction of the testicular steroidogenic pathway, compromising plasma and intratesticular testosterone production. In addition, we can mention the failure in the signaling of Leydig cells with Sertoli cells and macrophages. We observed defects in the sperm differentiation phase (which is highly androgen-dependent), and as a consequence, we identified head defects, protamination failures, DNA fragmentation, and changes in the dielectric properties of spermatozoa. In the present study, we further demonstrate those sperm dielectric properties associated with artificial intelligence modeling are promising for establishing a rapid diagnostic test for sperm changes due to viral infection. The results obtained provide an essential warning of potential fertility problems in individuals born to ZIKV-infected mothers during pregnancy.

Keywords: *Flaviviridae*; Progeny; Testis; Sperm; Testosterone; Assisted Reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Parâmetros biométricos e presença de proteínas virais nos testículos de indivíduos que nasceram de mães infectadas por ZIKV	443
Figura 2. Alterações no compartimento intertubular do testículo da prole infectada	465
Figura 3. Alterações no compartimento tubular do testículo da prole infectada	47
Figura 4. Parâmetros espermáticos dos camundongos nascidos de mães infectadas por ZIKV	498
Figura 5. Resumo e hipótese da patogênese de ZIKV em testículos de camundongos infectados durante a gestação	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados na técnica de imunohistoquímica.	27
Tabela 2: Sequência de primers para Q-PCR	29

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fertilização <i>in Vitro</i>
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
IIP	Injeção Intraperitoneal
LH	Hormônio Luteinizante
MIF	Fator Inibidor de Migração de Macrófagos
NS1	Proteína Não Estrutural 1
PFU	Unidades Formadoras de Placa
ZIKV	Zika Vírus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Zika Vírus.....	13
1.2 Sistema genital masculino.....	14
1.3 Zika vírus no sistema genital masculino.....	18
1.4. Zika vírus e a reprodução assistida.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.2. Objetivo geral.....	25
3.1. Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. Animais e infecção por ZIKV.....	26
4.2. Eutanásia, coleta e processamento dos tecidos.....	26
4.3. Imunohistoquímica.....	27
4.4. Q-PCR.....	28
4.4.1. Extração do RNA.....	28
4.4.2. Q-PCR.....	28
4.5. Mensuração da concentração de testosterona.....	29
4.5.1. Mensuração da concentração de testosterona plasmática.....	29
4.5.2. Mensuração da concentração de testosterona intratesticular.....	29
4.6. Análise espermática.....	30
4.6.1. Motilidade espermática.....	31
4.6.2. Vitalidade espermática.....	31
4.6.3. Morfologia espermática.....	31
4.6.4. Teste de protaminação do DNA espermático.....	32
4.6.5. Teste de fragmentação do DNA espermático.....	32

4.6.6. Inteligência Artificial	33
4.7. Análise estatística	33
5. RESULTADOS	34
5.1. Proteína do ZIKV está presente no parênquima testicular da prole	34
5.2. ZIKV inibe a esteroidogênese e altera a expressão de mediadores inflamatórios.....	34
5.3. As células de Sertoli são as mais afetadas pela infecção de ZIKV no compartimento tubular	34
5.4. ZIKV altera a morfologia e a integridade da cromatina nos espermatozoides	35
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO	42
8. FIGURAS.....	43
9. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Zika Vírus

O vírus da Zika (ZIKV) pertence à família *flaviviridae* e possui RNA de cadeia positiva (Song et al. 2017). Esse vírus foi isolado pela primeira vez no ano de 1947 em macacos rhesus (*Macaca mulata*). Em 1948, foi encontrado no mosquito *Aedes africanus* na Uganda, sugerindo uma possível forma de transmissão (Dick, Kitchen, and Haddow 1952). No início de 2015, o ZIKV foi reportado pela primeira vez na região Nordeste brasileiro (Campos, Bandeira, and Sardi 2015; Zanluca et al. 2015) e, no fim do mesmo ano, outros estados também já haviam sido atingidos (Gulland 2016b, 2016a; Pan American Health Organisation 2015). No início de 2016, foi classificado como emergência global de saúde pública (Gulland 2016b). No Brasil, as infecções por ZIKV no ano de 2020 somaram cerca de 7.120 casos, com uma maior prevalência no Nordeste, onde quase 50% dos casos no país se concentraram na Bahia (CGARB/DEIDT/SVS; CGLAB/DAEVS/SVS, 2020), enquanto já foram contabilizados mais de 6 mil casos no ano de 2021 (CGARB/DEIDT/SVS; CGLAB/DAEVS/SVS, 2021).

Assim como a Dengue e a Chikungunya, o ZIKV é transmitido pelo mosquito *Aedes aegypt* (Dégallier et al. 2000; Hayes 2009; Marchette, Garcia, and Rudnick 1969; Musso and Gubler 2016) e, na maioria dos casos, os pacientes são assintomáticos (Duffy et al. 2009) ou apresentam apenas sintomas brandos como erupção cutânea, febre e dor de cabeça, por volta de 5 a 7 dias depois da infecção viral (Cerbino-neto et al. 2016; Lazear et al. 2016). Em gestantes, associam-se graves problemas no desenvolvimento fetal, tais como morte, insuficiência placentária, restrição do crescimento e lesões no sistema nervoso central, incluindo microcefalia. Essa última condição ocorre em cerca de 6% dos casos de ZIKV congênita (Gogia and Kakar 2016; Hoen et al. 2018; Mlakar et al. 2016; Musso, Ko, and Baud 2019).

Além de transmissão vetorial e transversal, o ZIKV também pode ser transmitido via perinatal (Besnard et al. 2014), por transfusão sanguínea (Musso et al. 2014) ou por contato sexual (Foy et al. 2011; McCarthy 2016; Musso et al. 2015). O vírus utiliza os receptores DC-SIGN, AXL, Tyro3, TIM-1, da família dos

receptores de fosfatidilserina, para entrada nas células (Hamel et al. 2015), e pode ser identificado em vários fluidos corporais, como urina, saliva e sêmen (Atkinson et al. 2016; Barzon et al. 2018). Particularmente no sêmen das pessoas infectadas, o RNA viral pode ser detectado independente da presença do vírus no soro ou na urina (Atkinson et al. 2016) até 360 dias depois do início da apresentação de sintomas (Barzon et al. 2018). Esse longo tempo de eliminação viral sugere uma possível replicação viral no trato genital masculino (Musso et al. 2015). Esses estudos trouxeram grande preocupação sobre a prevenção da transmissão sexual da doença (Huits et al. 2016, 2017; Oster et al. 2016). Apesar desses dados, campanhas publicitárias que visam a conscientização da população acerca da proteção contra o ZIKV no Brasil, veiculadas pelo governo em diferentes instâncias, focam apenas na transmissão vetorial e vertical da doença (Coutinho et al. 2021). Não existem campanhas para o uso de preservativos para parceiros sexuais de mulheres grávidas (Coutinho et al. 2021). Contudo, a presença do vírus no sêmen por longos períodos, inclusive em material criopreservado (Ball et al. 2016; Borges et al. 2019; Petersen, Polen, et al. 2016), alertou profissionais e casais que se encontravam em processo de reprodução assistida (Baud et al. 2017; Yarrington et al. 2019), resultando na inclusão do exame para detecção do ZIKV nos protocolos laboratoriais do procedimento (Baud et al. 2017; Cordeiro et al. 2017).

1.2 Sistema genital masculino

Os principais componentes do sistema genital masculino são o testículo, epidídimo e glândulas sexuais anexas, incluindo a vesícula seminal, próstata e glândulas bulbouretrais, e tem como principal função a produção, maturação e estocagem dos gametas masculinos, assim como a produção de fluidos que compõe o sêmen (Setchell and Breed 2006).

Os testículos são órgãos pares localizados no escroto na maioria das espécies de mamíferos (Setchell and Breed 2006). Trata-se de um órgão ovoide com funções endócrinas (ex: produção de andrógenos) e exócrinas (produção de espermatozoides) (Fietz and Bergmann 2017), envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo denominada túnica albugínea (Leeson and Cookson 1974). Essa túnica emite septos em direção ao mediastino, dividindo o parênquima

testicular em lóbulos. Os lóbulos testiculares, por sua vez, são divididos morfofuncionalmente em dois compartimentos: o intersticial ou intertubular e o tubular (Russell et al. 1990). O compartimento intertubular é composto, principalmente, por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, macrófagos e células de Leydig que são responsáveis pela produção de andrógenos (Russell et al. 1990). O compartimento tubular compreende os túbulos seminíferos, que são estruturas convolutas que ocupam a maior parte do testículo, formados pela membrana basal, células peritubulares mióides, epitélio seminífero contendo células de Sertoli e células germinativas em diferentes estágios de diferenciação, e lúmen (Russell et al. 1990; Russell and de França 1995).

O epitélio seminífero é responsável pela produção de espermatozoides por meio da espermatogênese, um processo cíclico e altamente organizado, dividido em três fases: a fase espermatogonial, na qual as espermatogônias proliferam renovando a sua população, enquanto algumas são comprometidas com a formação do gameta. A fase espermatocitária ou meiótica é caracterizada pela duplicação do material genético, recombinação gênica e formação de células haplóides. Na fase espermiogênica, as espermatídes arredondadas sofrem um complexo processo de diferenciação, resultando na produção de espermatozoides (Hess and de Franca 2008; Russell et al. 1990; Russell and de França 1995).

Todo o processo espermatogênico é regulado e suportado pelas células de Leydig e de Sertoli (Hess and França 2005; Smith and Walker 2014). As células de Leydig, quando estimuladas pelo hormônio luteinizante (LH) através do seu receptor transmembranar, promovem o aumento citoplasmático do colesterol, que é transportado por meio da proteína STAR para a mitocôndria onde será convertido em pregnenolona através da enzima CYP11, e transportado novamente para o citoplasma onde é convertido em progesterona pela atividade da 3β HSD. A progesterona é convertida em androstenediona por meio da enzima CYP17. Sob a ação da enzima 17β HSD, a androstenediona é convertida em testosterona (Miller and Gucev 2014; Payne and Hales 2004; Smith and Walker 2014; Wang et al. 2019).

A testosterona, juntamente com o hormônio folículo-estimulante (FSH), atuam nas células de Sertoli que regulam a espermatogênese através da produção de vários fatores (Shaha 2008). As células de Sertoli também são responsáveis pelo suporte físico e nutricional das células germinativas bem como fagocitose de células germinativas no epitélio seminífero. Ainda, secretam fluido e estabelecem a barreira de células de Sertoli (Cheng and Mruk 2010; Hess and de Franca 2008) por meio de importantes proteínas (Fietz and Bergmann 2017; Yan Cheng and Mruk 2012) como Conexina 43 (Brehm et al. 2007; Weider, Bergmann, and Brehm 2011) e Claudina 11 (Gow et al. 1999; McCabe et al. 2016). Essa união entre as células de Sertoli separa o epitélio seminífero em dois compartimentos: o basal (onde se encontram as espermatogônias e espermátocitos primários) e o adluminal (contendo espermátocitos primários, espermátocitos secundários e espermátides) (Dym and Fawcett 1970).

A barreira hematotesticular confere, juntamente com as células peritubulares mioides, células endoteliais, células de Leydig e macrófagos residentes, um ambiente de imunoprivilégio ao testículo (Fietz and Bergmann 2017; Fijak, Bhushan, and Meinhardt 2011; Wu et al. 2016; Yan Cheng and Mruk 2012). Alguns vírus, se aproveitam desse ambiente imunoprivilegiado para se manterem viáveis em células testiculares (Dejucq and Jégou 2001). Uma vez interrompida essa condição de imunoprivilégio, tanto a espermatogênese quanto a esteroidogênese podem ficar comprometidas, levando à quadros temporários ou permanentes de infertilidade (Fijak et al. 2011).

Os gametas produzidos no testículo são direcionados para a rede testicular e ductulos eferentes, local em que parte do fluido produzido pelas células de Sertoli é reabsorvido (Petersen and Söder 2006). A seguir, os espermatozoides são direcionados para o epidídimo e sofrem o processo de maturação e estocagem pela ação de diversas proteínas secretadas localmente no epidídimo (Robaire and Viger 1995; Sullivan, Frenette, and Girouard 2007). O mesmo é regulado por meio de andrógenos (Ezer and Robaire 2002) e estrógenos (Hess et al. 2011), e o desbalanço do controle hormonal pode resultar em diversas alterações epididimárias e espermáticas (Hess et al. 2000; Joseph

et al. 2010), podendo resultar em gametas inaptos para o processo de fertilização (Ezer and Robaire 2002).

Os espermatozoides, no momento da ejaculação, entram em contato com líquidos produzidos pelas glândulas sexuais anexas, ricos em substâncias que nutrem e protegem o gameta masculino (Abrahamsohn 2013; Du Plessis, Gokul, and Agarwal 2013). Os fluidos provenientes do epidídimo, somados aos da vesícula seminal e da próstata, são também fundamentais para a coagulação e liquefação do sêmen, importantes parâmetros macroscópicos avaliados durante a realização do espermograma (Lilja, Abrahamsson, and Lundwall 1989; Peruzzato et al. 2017). Somado aos parâmetros microscópicos, a análise seminal também consiste na avaliação da viscosidade, volume, aspecto e PH da amostra (Peruzzato et al. 2017; WHO 2010, 2021). Além de uma morfologia adequada de cabeça, peça intermediária e cauda, os espermatozoides devem apresentar um padrão apropriado de vitalidade e motilidade para que sejam células viáveis para a fecundação (WHO 2010, 2021). Ademais, os gametas masculinos presentes no sêmen precisam ainda passar pelo processo de capacitação, que acontece ao entrarem em contato com o trato genital feminino (Visconti et al. 1998; Wassarman 1987). Esse processo resulta em mudanças nos componentes da membrana dos espermatozoides aliado a um aumento no metabolismo (De Jonge 2005; Visconti et al. 1998; Wassarman 1987). Assim, essas células se tornam capazes de sofrer a reação acrossômica, importante para a fertilização (Saling and Storey 1979; Wassarman 1987).

Alguns fatores como idade (Smit et al. 2010), dieta (Vujkovic et al. 2009), consumo de álcool (Anifandis et al. 2014) e tabagismo (Sepaniak et al. 2006) contribuem para aumento no índice de fragmentação do DNA por meio da elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), desencadeando a queda da qualidade espermática (Anifandis et al. 2014; Smit et al. 2010; Verza Jr. et al. 2017; Vujkovic et al. 2009). Todavia, as EROs são naturalmente produzidas nos gametas masculinos (Gil-Guzman et al. 2001). É válido destacar que a cromatina dessas células passa pela protaminação, que consiste na substituição de histonas por protaminas no DNA. As protaminas moldam a dupla-fita em estruturas toroidais, tornando-a mais compacta, o que é fundamental para

proteger o material genético de danos causados por radicais livres (Aitken and De Iuliis 2007; Beletti 2013; Carrell 2012; Oliva 2006; Simon, Emery, and Carrell 2019). Além disso, as EROs podem também efeitos ter protetores contra patógenos nos espermatozoides quando em quantidades baixas e controladas (Aitken and Fisher 1994). Entretanto, o aumento exacerbado do estresse oxidativo intracelular pode ser danoso, levando a um aumento da fragmentação do DNA espermático (Saleh et al. 2002; Simon et al. 2019).

1.3 Zika vírus no sistema genital masculino

A detecção do ZIKV no sêmen, independente da sua presença no sangue, sugere a ocorrência de replicação viral no sistema genital masculino (Musso et al. 2015). Em macacos, o vírus foi detectado na próstata e na vesícula seminal (Hirsch et al. 2017; Ma, Li, Ma, Jia, Zhang, Zhang, Zhang, Wong, Zhang, Lu, Liu, Yan, Li, C. Qin, et al. 2016). Alguns trabalhos também mostram a presença do ZIKV no sêmen de homens vasectomizados (Arsuaga et al. 2016; Froeschl et al. 2017; Huits et al. 2017). Ademais, MEAD e colaboradores (2018) identificaram o RNA viral no ejaculado de homens infectados 281 dias após o início da manifestação da doença. Cabe ressaltar que camundongos infectados e vasectomizados, apresentavam níveis significativamente menores de partículas virais infecciosas no fluido seminal (Duggal et al. 2017; Mead et al. 2018). Esses dados reforçam a ideia de que o testículo e o epidídimo são importantes reservatórios virais (Le Tortorec et al. 2020). Ainda, células de Sertoli e espermatozoides expressam Tyro3 e AXL. Esse último também expresso no epidídimo (Bagasra et al. 2017; Hamel et al. 2015; Kurscheidt et al. 2019; Ma, Li, Ma, Jia, Zhang, Zhang, Zhang, Wong, Zhang, Lu, Liu, Yan, Li, C. C. Qin, et al. 2016).

Estudos utilizando testículos de animais deficientes para receptor $INF\alpha/\beta$ revelam que o ZIKV possui tropismo para as células peritubulares mióides, células de Leydig, células de Sertoli, espermátócitos primários e espermatogônias (Govero et al. 2016; Robinson et al. 2018; Uraki et al. 2017). O início da infecção se dá no compartimento intertubular, seguindo para o compartimento tubular, onde os primeiros alvos são as células de Sertoli e as espermatogônias e, posteriormente, os espermátócitos primários (Tsetsarkin et

al. 2018). As células de Sertoli são um dos principais alvos do vírus no testículo (Kurscheidt et al. 2019) pois apresentam alta expressão de AXL, usada como porta de entrada pelo vírus (Hamel et al. 2015; Mansuy et al. 2016). A infecção das células de Sertoli resultam em danos nas junções intercelulares (Sheng et al. 2017), desestabilizando a barreira hematotesticular (Govero et al. 2016). Estudos *in vitro* demonstraram que células de Sertoli humanas alteram o seu perfil transcricional e podem suportar a replicação viral por pelo menos 6 semanas (Kumar et al. 2018). Winkler e colaboradores (2017) não observaram apoptose em espermatogônias de camundongos imunodeficientes, sugerindo que essas células também funcionariam como reservatório viral. No geral, o peso testicular de animais infectados se encontra reduzido, assim como os níveis de testosterona sérica e intratesticular (Govero et al. 2016; Ma, Li, Ma, Jia, Zhang, Zhang, Zhang, Wong, Zhang, Lu, Liu, Yan, Li, C. C. Qin, et al. 2016; Sheng et al. 2017; Uraki et al. 2017), que é um importante indicativo de infecção nas células de Leydig (Uraki et al. 2017).

O processo infeccioso no epidídimo se assemelha ao do parênquima testicular, onde primeiramente as células do compartimento intersticial são afetadas seguindo para o epitélio epididimário (Tsetsarkin et al. 2018). A infecção por ZIKV induz respostas imunes com a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, afetando as células do epitélio epididimário (Ma, Li, Ma, Jia, Zhang, Zhang, Zhang, Wong, Zhang, Lu, Liu, Yan, Li, C. C. Qin, et al. 2016). As células epiteliais passam a apresentar vacúolos, diminuição em seu tamanho e perda de estereocílios (Ma, Li, Ma, Jia, Zhang, Zhang, Zhang, Wong, Zhang, Lu, Liu, Yan, Li, C. C. Qin, et al. 2016), o que influencia diretamente na maturação espermática (Kurscheidt et al. 2019).

O vírus é encontrado tanto no fluido epididimário quanto nos espermatozoides presentes no lúmen do epidídimo (Govero et al. 2016). A evidência de partículas virais em locais anatômicos prévios à uretra pélvica indicam que o vírus pode ter sido adquirido no testículo e/ou no próprio epidídimo (Tsetsarkin et al. 2018). No sêmen de animais imunodeficientes e pacientes infectados por ZIKV, o RNA viral pode ser detectado (Joguet et al. 2017; Kurscheidt et al. 2019) até 188 dias corridos após o início dos sintomas (Barzon

et al. 2016; Nicastri et al. 2016) e até 370 dias intermitentemente (Barzon et al. 2018).

No espermatozoide, sabe-se que o vírus possui tropismo para a cabeça e para a peça intermediária de gametas vivos (Bagasra and Addanki 2017; Mansuy et al. 2016). A avaliação espermática de indivíduos infectados se encontra alterada, apresentando maior quantidade de espermatozoides com morfologia anormal, proporções baixas de concentração espermática, menor motilidade, pior vitalidade e elevadas taxas de fragmentação de DNA (Govero et al. 2016; Griffin et al. 2017; Joguet et al. 2017; Kurscheidt et al. 2019; Sheng et al. 2017).

Recentemente, estudos têm sido desenvolvidos a fim de se investigar o impacto potencial do ZIKV na prole de mães infectadas. Stanelle-Bertram e colaboradores (2018) observaram, em camundongos, alterações neuronais de aprendizagem e memória, alertando para o possível risco do desenvolvimento de outros distúrbios em diferentes órgãos. Outro estudo identificou a presença de biomarcadores de inflamatórios na saliva de crianças com microcefalia de até dois anos de idade que nasceram de mães infectadas pelo ZIKV durante a gestação, sugerindo que a infecção pode ocasionar um quadro de inflamação neurológica contínua (Oliveira et al. 2019). Ainda outro estudo retratou casos de crianças de 3 e 4 anos com microcefalia, decorrente de infecção por ZIKV durante a gestação, e nelas foram observados casos de criptorquidismo (De Vasconcelos et al. 2020).

Alterações sistêmicas foram descritas em camundongos adultos que nasceram de fêmeas previamente infectadas por ZIKV ainda no período gestacional (Camargos et al. 2019). Estes animais apresentaram diminuição do volume cerebral, anormalidades oftalmológicas e mudanças na microarquitetura óssea (Camargos et al. 2019). Também foram observadas alterações na morfologia testicular, como redução volumétrica do túbulo seminífero, acompanhado do aumento do índice de células germinativas apoptóticas e decréscimo do índice meiótico e da eficiência de células de Sertoli (Camargos et al. 2019). Entretanto, os dados acerca desse modelo ainda são escassos, fazendo-se necessário estudos complementares a fim de se melhor caracterizar

e entender o impacto da infecção por ZIKV na biologia reprodutiva desses indivíduos.

1.4. Impacto do Zika vírus na reprodução assistida

A reprodução assistida consiste na manipulação de gametas ou embriões fora do corpo humano, incluindo procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV) e inseminação artificial (American Society for Reproductive Medicine - ASRM n.d.; Centers for Disease Control and Prevention - CDC n.d.; The Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada - SOGC n.d.). A reprodução assistida é comumente utilizada em tratamentos para problemas de fertilidade (Pelegriana, Kessler, and Rawlins 1991) com objetivo final de se obter a gestação (Zegers-Hochschild et al. 2009). As técnicas de reprodução assistida são classificadas em baixa complexidade, como coito programado (Heuschkel 2015) e inseminação intrauterina (IIU) (Abou-Setta et al. 2006), e alta complexidade, envolvendo FIV clássica e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (Palermo et al. 1992), que necessitam do manejo específico de oócitos, espermatozoides e de sêmen dos próprios pacientes ou de doadores (Zegers-Hochschild et al. 2009).

Em alguns casos de infertilidade masculina, como varicocele (Abd-Elmoaty et al. 2010), leucocitospermia (Agarwal et al. 2014) ou até mesmo infertilidade idiopática (Pasqualotto et al. 2001), foi observado um alto nível de agentes oxidantes e baixos níveis de enzimas antioxidantes, resultando no aumento da fragmentação do DNA espermático (Simon et al. 2019). Tais problemas estão diretamente relacionados à diminuição nas taxas de fertilização em procedimentos como FIV, ICSI e IIU, além da redução da qualidade embrionária, queda das taxas de gravidez e aumento das taxas de aborto espontâneo (Esteves et al. 2021; Simon et al. 2019).

Conforme supracitado, a infecção por ZIKV pode desencadear sérios problemas fetais (Gogia and Kakar 2016; Miner et al. 2016; Mlakar et al. 2016). O ZIKV pode infectar tanto o gameta feminino (Araújo Filho et al. 2019; Prisant et al. 2019), quanto o masculino (Joguet et al. 2017; Mansuy et al. 2016; Matusali et al. 2018) onde o RNA viral pode se manter detectável por um longo tempo (Barzon et al. 2016; Nicastri et al. 2016). Mesmo após o processo de

criopreservação, as partículas virais podem ser detectadas nas amostras (Ball et al. 2016; Borges et al. 2019; Petersen, Polen, et al. 2016). Assim, uma eventual contaminação do embrião é perfeitamente plausível (Araújo Filho et al. 2019; Borges et al. 2019; Petersen, Meaney-Delman, et al. 2016). Com isso, se faz necessário que os casais que pretendem engravidar tomem conhecimento das orientações provenientes do ministério da saúde e de outros guias internacionais que recomendam tanto a testagem sorológica, quanto o uso de preservativos ou abstinência sexual por 6 meses para homens após o início dos sintomas ou potencial exposição ao vírus, sendo que este cuidado deve se estender para o período da gestação (Ball et al. 2016; Brasil 2020; Cordeiro et al. 2017; Duarte et al. 2021; Petersen, Polen, et al. 2016). Alguns autores ainda defendem a criopreservação do sêmen antes de viagens para áreas endêmicas (Ball et al. 2016; Feinberg 2017; Kurscheidt et al. 2019; Oduyebo et al. 2017).

É importante ressaltar que o resultado negativo em um teste sorológico não garante a ausência do vírus no organismo, uma vez que partículas virais podem estar presentes no sêmen mesmo não sendo detectável no sangue ou em demais fluidos (Atkinson et al. 2016; Barzon et al. 2016; Gornet, Bracero, and Segars 2016; Musso et al. 2017; Nicastri et al. 2016). Neste contexto, os testes para detecção de anticorpos não são precisamente recomendados devido às limitações e dificuldades de interpretações, além dos altos índices de falso-positivo e reações cruzadas com outros flavivírus (Oduyebo et al. 2017; Rabe et al. 2016). Por outro lado, para análises por RT-PCR, principal teste usado em casos de transmissão sexual (ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2020; Gornet et al. 2016), um resultado positivo não significa necessariamente uma infecção (Petersen, Polen, et al. 2016). Além disso, persistem limitações quanto à validação do uso dessa técnica para o sêmen (Gornet et al. 2016; Petersen, Polen, et al. 2016) e tampouco existem testes de diagnósticos rápidos para a detecção do vírus no sêmen (Borges et al. 2019).

Como a maioria dos pacientes acometidos pelo ZIKV é assintomática (Duffy et al. 2009; Musso et al. 2019), faz-se necessário um cuidado extra, principalmente quando se trata de amostras provenientes de áreas endêmicas desse vírus (Oduyebo et al. 2017; Rabe et al. 2016). Ademais, protocolos

antivirais parecem não ser efetivos contra o ZIKV (Borges et al. 2019; Joguet et al. 2017; Petersen, Polen, et al. 2016). Mesmo com todas as recomendações para testagem de pacientes que desejam se submeter às técnicas de reprodução assistida (Ball et al. 2016; Duarte et al. 2021; Petersen, Meaney-Delman, et al. 2016; Petersen, Polen, et al. 2016), a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, responsável por regulamentar os procedimentos nos centros de reprodução humana no Brasil (ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2011), emitiu, em 2020, uma consulta pública que se encontra em vias de aprovação, na qual os testes anti-ZIKV seriam retirados para pacientes que não são doadores (ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2020).

Levando-se em consideração a situação perigosa desta infecção no Brasil (Coutinho et al. 2021; Musso et al. 2019), torna-se urgente o desenvolvimento de testes, aplicados às clínicas de reprodução humana, capazes de detectar ZIKV no sêmen. Ainda, são necessários protocolos eficientes que purifiquem as amostras infectadas (Borges et al. 2019; Joguet et al. 2017; Petersen, Polen, et al. 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Conforme introdutoriamente descrito, o ZIKV é transmitido por meio da picada do mosquito *Aedes aegypt*, contato sexual e transmissão vertical. A infecção em gestantes está associada a graves problemas no desenvolvimento fetal. É importante ressaltar que além da transmissão vertical, o ZIKV se tornou uma grande preocupação no campo da reprodução humana assistida, uma vez que o sêmen pode carrear o RNA viral por um longo período. Assim, riscos de infecção são gerados ao embrião e podem ter repercussões negativas no desenvolvimento e na fase adulta. Vários estudos já demonstraram a presença e o efeito deletério desse vírus no trato genital masculino e no sêmen de animais infectados, nos quais os principais parâmetros espermáticos se encontram alterados. Porém, até então, apenas um único trabalho, do nosso grupo de pesquisa, descreve algumas alterações testiculares em animais nascidos de mães infectadas durante a gestação. Dessa forma, os dados do presente trabalho detalham as alterações testiculares e espermáticas decorrentes da infecção intrauterina. Os potenciais problemas de fertilidade em decorrência desta infecção viral devem ser divulgados para prevenir a infecção viral e estimular o desenvolvimento de técnicas e metodologias de diagnóstico viral no sêmen.

3. OBJETIVOS

3.2. Objetivo geral

Investigar as possíveis alterações causadas pelo ZIKV nos testículos e espermatozoides de camundongos adultos nascidos de mães infectadas durante a gestação.

3.1. Objetivos específicos

Investigar a presença de proteínas do ZIKV no parênquima testicular;

Avaliar as alterações presentes no compartimento intertubular quanto à esteroidogênese e resposta antiviral;

Avaliar as alterações morfofuncionais presentes no compartimento tubular quanto aos componentes somáticos e germinativos;

Avaliar a qualidade espermática quanto à motilidade, vitalidade, morfologia e integridade da cromatina dos espermatozoides.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais e infecção por ZIKV

Doze camundongos C57BL/6 fêmeas e quatro camundongos C57BL/6 machos (8-12 semanas) procedentes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram mantidos em caixas para o acasalamento (proporção de 3 fêmeas para 1 macho), com água e comida à vontade no Laboratório de Imunofarmacologia.

Após a observação do plug vaginal, as fêmeas foram separadas e divididas aleatoriamente em dois grupos: 1) Controle (n=6) – injeção intraperitoneal (IIP) de PBS no dia embrionário 5.5; 2) ZIKV (n=6) – IIP de 10^6 Unidades Formadoras de Placa (PFU)/animal da cepa brasileira, no dia embrionário 5.5, de acordo com Camargos e colaboradores (2019) (Figura 1a). O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº. 217/2017; CEUA-UFMG) e todos os procedimentos obedeceram aos Princípios Éticos da Experimentação Animal (CONCEA/MCTIC).

4.2. Eutanásia, coleta e processamento dos tecidos

Da prole, 12 semanas após o nascimento, oito machos de cada grupo foram pesados e submetidos a eutanásia por decapitação em guilhotina apropriada. Os testículos, epidídimos e vesícula seminal foram coletados e pesados. O índice anogenital foi mensurado com auxílio de um paquímetro digital e o valor obtido foi corrigido em relação à raiz cúbica do peso corporal, obtendo-se assim o índice anogenital (Auharek et al. 2012).

Cinco testículos de ambos os grupos foram embebidos em glutaraldeído (a 4% v/v em tampão fosfato 0,05M; n=5) e em methacarn (n=5) por 24 horas. Posteriormente, os testículos foram armazenados em solução de tampão fosfato 0,05M e álcool 70%, respectivamente. As amostras fixadas em methacarn foram destinadas para a realização dos testes de imunohistoquímica. Adicionalmente, seis testículos foram congelados a -80°C para as técnicas de qPCR e mensuração da testosterona intratesticular.

Epidídimos de oito animais, em cada grupo, foram embebidos em meio de cultura DMEM para posterior análise espermática. Ainda, amostras de sangue foram obtidas e devidamente processadas para análise hormonal.

4.3. Imunohistoquímica

Para as análises de imunohistoquímica, as amostras de testículo, fixadas em methacarn, foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e incluídas em Paraplast®. O material foi seccionado com 6µm de espessura e os cortes foram aderidos em lâminas previamente tratadas com Poly-L-Lisina (Sigma). Em seguida, as secções obtidas passaram pelo processo de desparafinização em xilol e hidratação utilizando concentrações decrescentes de álcool e água destilada. Posteriormente, realizamos o bloqueio da peroxidase endógena (3% de H₂O₂ (Sigma) em PBS) seguido de lavagens em PBS. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato por 15 minutos em micro-ondas e, após o resfriamento das amostras, realizou-se o bloqueio da ligação inespecífica com soro normal de coelho (3βHSD) ou com Protein block - Abcam (ZIKV NS1 e Connexina43). Em seguida, realizamos a incubação com anticorpos primários descritos na tabela 1, à 4°C “*overnight*”. Para todas as reações, foram realizados controles negativos, omitindo o anticorpo primário.

Após lavagem em tampão PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado por uma hora. Em seguida, foram expostas à estreptavidina durante 20 minutos. A reação de revelação ocorreu utilizando-se substrato da peroxidase 3,3-diaminobenzidina (Sigma) e as amostras foram então contra-coradas com Hematoxilina (Merck), desidratadas e posteriormente analisadas sob microscopia de luz.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados na técnica de imunohistoquímica.

Anticorpo	Diluição	Fabricante	Tipo de anticorpo
anti-ZIKV NS1	1:100	GTX133308, GeneTex	Policlonal, coelho
anti-3βHSD	1:100	SC-30820, Santa Cruz Biotechnology	Policlonal, cabra
anti-Cd68	1:100	ab955, Abcam	Monoclonal, camundongo
anti- CONEXINA43	1:100	SC-9059, Santa Cruz Biotechnology	Policlonal, coelho

4.4. Q-PCR

4.4.1. Extração do RNA

As amostras testiculares mantidas à -80°C foram submetidas à extração de RNA total. Metade do testículo foi triturado em gelo seco, adicionando-se 1 mL de Trizol® (Invitrogen). Posteriormente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio (Sigma) para cada amostra, agitando os microtubos por 3 minutos à temperatura ambiente. O homogeneizado foi centrifugado (12000 g) durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo o RNA foi cuidadosamente removido e transferido para um novo microtubo. Na sequência, adicionou-se 500 µL de isopropanol (Sigma) ao sobrenadante que ficou incubado à 4°C por 20 minutos para promover a precipitação do RNA. Após centrifugação (12000 g, 15 minutos, a 4°C), descartou-se o sobrenadante, e o pellet de RNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% (Sigma) gelado, exposto ao vortex e centrifugado a 7500 g por 2 minutos a cada lavagem. Por fim, após secagem por 1 hora, o pellet de RNA foi ressuspenso em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A integridade e a concentração do RNA obtido das amostras foram analisadas em espectrofotômetro nanodrop (Thermo Fischer, USA).

4.4.2. Q-PCR

A partir do RNA (2µg/amostra) extraído dos testículos dos diferentes grupos estudados, o cDNA foi obtido utilizando o kit High Capacity cDNA RT (Applied Biosystem®). Para dosagem de expressão gênica por meio de q-PCR, o cDNA (10ng) foi amplificado com o iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad, USA) no equipamento CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad, USA) utilizando pares de iniciadores construídos para diferentes sequências de interesse (*Ar*, *Caspase-3*, *Claudina-11*, *Conexina-43*, *Cox2*, *Cyp11*, *Il10*, *Inos*, *Katnal1*, *Lhr*, *Star*, *Stra8*, *Tnf*, *Vasa*, *Wt1*, *3βhsd* e *17βhsd*) (Tabela 2). Os iniciadores foram padronizados no StepOnePlus Real-Time PCR System (Life) em diferentes concentrações e temperaturas de anelamento. O nível de expressão relativa foi determinado usando como normalizador o gene *Gapdh* e utilizando o método $\Delta\Delta CT$.

Tabela 2: Sequência de primers para Q-PCR

Nome do gene	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')
<i>Ar</i>	TCCAAGACCTATCGAGGAGCG	GTGGGCTTGAGGAGAACCAT
<i>Caspase-3</i>	CTCGCTCTGGTACGGATGTG	TCCATAAATGACCCCTTCATCA
<i>Claudinna-11</i>	GTGGTGGGTTTCGTCACGAG	CGTCCATTTTTTCGGCAGGTG
<i>Conexina-43</i>	ACA GCG GTT GAG TCA GCT TG	GAG AGA TGG GGA AGG ACT TGT
<i>Cox2</i>	ACG GTC CTG AAC GCA TTT ATG	TTG GCC CCA TTT AGC AAT CTG
<i>Cyp11</i>	CAGATTGTGTTTGTGACGTTGC	CGGTTGAAGTACCATTCTGGC
<i>Il10</i>	CCC ATT CCT CTG CAC GAT CTC	TCA GAC TGG TTT GGG ATA GGT TT
<i>Inos</i>	GTT CTC AGC CCA ACA ATA CAA GA	GTG GAC GGG TCG ATG TCA C
<i>Katnal1</i>	ATG AAT TTG GCG GAG ATT TGT GA	GTG CTG ACG ATA CTC TTA ACC TG
<i>Lhr</i>	CGC CCG ACT ATC TCT CAC CTA	GAC AGA TTG AGG AGG TTG TCA AA
<i>Star</i>	TGCCATCATTTCATTTCATCCTT	AAAAGCGGTTTCTCACTCTCC
<i>Stra8</i>	ACCCTGGTAGGGCTCTTCAA	GACCTCCTCTAAGCTGTTGGG
<i>Tnf</i>	CCC TCA CAC TCA GAT CAT CTT CT	GCT ACG ACG TGG GCT ACA G
<i>Vasa</i>	GAG GTT TTG CTA TCA GTG CTG	TGG CCC GTT TAG ATC CAA TTT TG
<i>Wt1</i>	CAA GGA CTG CGA GAG AAG GTT T	TGG TGT GGG TCT TCA GAT GGT
<i>3βhsd</i>	AGCTCTGGACAAAGTATTCCGA	GCCTCCAATAGGTTCTGGGT
<i>17βhsd</i>	TGGCTGTTTCGCCTAGCTTC	GGCCTCCAACAATGGTCCC

4.5. Mensuração da concentração de testosterona

4.5.1. Mensuração da concentração de testosterona plasmática

As amostras de sangue obtidas foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 2000rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e armazenado em um novo microtubo, em freezer -80°C, até o momento da análise. A concentração de testosterona plasmática foi mensurada a partir do ensaio de eletroquimiluminescência realizada pelo Laboratório Tecs (Tecnologia em Sanidade Animal) em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil com os coeficientes intra ensaio e inter ensaio de 9% e 10%, respectivamente.

4.5.2. Mensuração da concentração de testosterona intratesticular

4.5.2.1. Extração da testosterona

As amostras testiculares mantidas à -80°C foram submetidas à extração da testosterona intratesticular. Metade dos testículos foram homogeneizados em PBS autoclavado (1 mg de tecido / 9 µL de PBS). Desse preparo, 60 µL de amostra foram ressuspensos em 30 µL de água destilada. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de éter etílico grau HPLC e agitados em vórtex por 120

minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 4500 rpm por 20 minutos a 4°C e levados ao freezer -80°C por 30 minutos para congelamento da fase aquosa. Feito isso, a fase com éter foi transferida para um novo ependorff onde o conteúdo foi destinado para evaporação em capela de exaustão “*overnight*”. O pellet resultante da evaporação foi ressuspenso em 30 µL de água destilada, agitados por 120 segundos e, depois, centrifugados a 13000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para posterior ensaio de ELISA.

4.5.2.2. ELISA

A testosterona extraída do tecido foi analisada por meio do kit comercial de teste de testosterona, utilizando o protocolo Enzimaimunoensaio (Monobind inc., USA). Para este propósito, 10 µL dos calibradores, controles e amostras foram pipetados em cada micropoço da placa, seguido pela adição de 50 µL do reagente de trabalho (conjugado enzimático). A placa foi agitada suavemente por 30 segundos e, então, 50 µL do reagente Biotina Testosterona foram suplementados e incubados por 60 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o conteúdo de toda a placa foi descartado e lavado com 300 µL de solução de lavagem e, então, adicionou-se 100 µL da solução de trabalho (substrato) em todos os micropoços, que foram incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados 50 µL da solução de parada seguido do direcionamento da placa para o leitor de ELISA. A leitura de cada microcavidade foi realizada em 450 nm, utilizando o comprimento de onda de referência de 620-630 nm para minimizar as imperfeições da cavidade. A absorbância de cada duplicata representa a concentração de testosterona (ng/mL) da amostra correspondente.

4.6. Análise espermática

Os epidídimos de cada animal, obtidos no momento da coleta, foram transferidos para uma placa de Petri contendo 500µL de meio de cultura DMEM, onde foram macerados com agulhas de 24G. Após a maceração do tecido, a suspensão contendo espermatozoides foi coletada e homogeneizada em um microtubo para as análises de vitalidade e motilidade espermática.

Ademais, 10 μ L do preparo foi depositado em lâminas de vidro, onde foi feito esfregaço. Depois de secas, as lâminas foram fixadas em álcool 95% por 5 minutos para posterior análise de morfologia, protaminação e fragmentação de DNA espermático, utilizando colorações específicas. Os protocolos utilizados neste estudo foram adaptados do Manual de Laboratório da OMS para o exame e processamento de sêmen humano (WHO, 2010) e descritos por Vieira (2019).

4.6.1. Motilidade espermática

A análise da motilidade foi feita com 10 μ L da amostra homogeneizada em uma lâmina de vidro coberta com uma lamínula de 22mm x 22mm, sob microscopia óptica, em aumento de 400x. Foram avaliados 200 espermatozoides em pelo menos 5 diferentes campos e os mesmos foram classificados em: progressivos (espermatozoides que nadam para frente de forma ativa), não progressivos (espermatozoides que se movem em círculos ou no mesmo ponto sem progressão) e imóveis (sem movimento detectado). A determinação da motilidade total (%) foi determinada de acordo com a soma de progressivos e não progressivos dividido por 200 (Vieira 2019; WHO 2010).

4.6.2. Vitalidade espermática

Para avaliação da vitalidade espermática, 5 μ L da amostra foram diluídos em 5 μ L de solução de eosina (0,5% p/v de eosina Y dissolvida em solução de NaCl a 0,9% p/v em água deionizada). Os 10 μ L resultantes (amostra + eosina) foram depositados em uma lâmina de vidro e coberto com uma lamínula de 22mm x 22mm, e levadas ao microscópio óptico. Para a análise, 200 espermatozoides foram avaliados em aumento de 400x. Os espermatozoides corados pela eosina foram contados como mortos, enquanto os não corados, contabilizados como vivos. A proporção da vitalidade da amostra foi calculada a partir do número de espermatozoides vivos dividido por 200 (Vieira 2019).

4.6.3. Morfologia espermática

Para a análise da morfologia dos espermatozoides, lâminas previamente obtidas foram coradas com Hematoxilina (Merck) e Eosina, e analisadas sob microscopia de luz em aumento de 1000x com uso de óleo de imersão. Considerando as três principais estruturas do espermatozoide (cabeça, peça intermediária e cauda), duzentos (200) espermatozoides selecionados

aleatoriamente foram classificados como normal (todas as estruturas dentro do padrão esperado) ou anormal (possui um ou mais defeitos morfológicos) (Vieira 2019; WHO 2010). Para o caso de espermatozoide anormal, foi especificado em qual estrutura os defeitos ocorreram, bem como o seu tipo, seguindo a classificação descrita por Vieira (2019) para murinos.

4.6.4. Teste de protaminação do DNA espermático

A análise de protaminação do DNA dos espermatozoides foi feita pela incubação dos esfregaços com o corante Azul de Anilina a 5% em Ácido Acético 4% por 5 minutos, seguido de breve lavagem em água destilada. A análise foi feita sob microscópio óptico, na qual 300 espermatozoides foram avaliados e classificados em: gametas com DNA não protaminado (células positivas corados de azul) e gametas com DNA íntegro/protaminado (células negativas, não coradas). Posteriormente, a proporção individual de gametas com o DNA não-protaminado (células positivas/total de células contadas) foi considerada para os devidos cálculos estatísticos (POURMASUMI et al., 2019). O controle positivo foi devidamente preparado utilizando-se uma solução de desnaturação (HCl 0,08N, NaCl 0,15M e 0,1% Triton X-100; pH 1,2 corrigido com HCl ou NaOH) por 30 segundos, seguido de incubação em solução de peróxido de hidrogênio 7%, em temperatura ambiente por 10 minutos (SIMAS, 2020-ADAPTADO).

4.6.5. Teste de fragmentação do DNA espermático

Para a análise de fragmentação do DNA, as lâminas de esfregaço foram coradas por 5 minutos com uma solução de 10mL de Laranja de Acridina a 0,1% em água destilada acrescido de uma solução de 2,5mL de Na₂HPO₄ 0,3M e 40mL de ácido cítrico 0,1M (PH 4.0) (VIRANT-KLUN; TOMAZEVIC; MEDEN-VRTOVEC, 2002). Para controle positivo, o esfregaço foi submetido previamente à solução de desnaturação (HCl 0,08N, NaCl 0,15M e 0,1% Triton X-100; pH 1,2 corrigido com HCl ou NaOH) por 30 segundos, seguido pela incubação em uma solução de peróxido de hidrogênio 7% por 10 minutos, em temperatura ambiente (SIMAS, 2020-ADAPTADO).

Após a coloração, as lâminas foram imediatamente analisadas sob microscópio de fluorescência, pelo qual foram obtidas fotomicrografias utilizando-se filtros verde (FITC; 488 nm de excitação) e vermelho (TRITC; 546

nm de excitação). Após a sobreposição das imagens capturadas, 300 espermatozoides foram classificados em: gametas com DNA íntegro (com emissão de fluorescência verde) e gametas com DNA fragmentado (com emissão de fluorescência vermelha). Feito isso, o Índice de fragmentação do DNA (IFD = células com fluorescência vermelha/total de células contadas) foi considerado para os devidos cálculos estatísticos.

4.6.6. Inteligência Artificial

Essa metodologia foi desenvolvida no Laboratório de Nanodispositivos e Sensores do Departamento de Física da UFMG. Logo após a coleta, parte do fluido espermático foi fixado em álcool 70% e foram confeccionadas lâminas para as análises espectroscópicas. Após incididas por um feixe de laser, os padrões dielétricos e anisotrópicos (difração, refração, absorção e reflexão) das amostras foram capturados por sensores. Posteriormente, os dados foram tratados com algoritmos de inteligência artificial. De acordo com a modelagem, conseguimos um reconhecimento específico das amostras, com eficiência acima de 89%. Na sequência, foram feitos testes com o fluido seminal de camundongos infectados para que o software informasse a probabilidade de a amostra ser do animal controle ou infectado.

4.7. Análise estatística

Todos os dados quantitativos obtidos foram testados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis foram submetidas à análise de Teste T (dados paramétricos) e Mann-Whitney (dados não-paramétricos). O programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc) foi utilizado para o tratamento estatístico dos dados e o nível de significância considerado foi $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Proteína do ZIKV está presente no parênquima testicular da prole

Apesar de não observarmos diferenças no peso corporal ($p > 0.05$; Figura 1b), os animais infectados apresentaram menores pesos testiculares (Figura 1c; $p < 0.05$) e reduzido índice anogenital ($p < 0.01$; Figura 1d) quando comparado com o grupo controle. Por meio da imuno-histoquímica, a proteína não estrutural do ZIKV (NS1) foi identificada em diferentes tipos celulares do parênquima testicular, tais como: Leydig, Peritubular mioide, Sertoli, Pré-Leptóteno, Leptóteno, Zigóteno, Paquíteno e Diplóteno (Figura 1e-n).

5.2. ZIKV inibe a esteroidogênese e altera a expressão de mediadores inflamatórios

As moléculas da via esteroidogênica das células de Leydig se mostraram alteradas nos indivíduos infectados por ZIKV. Observamos uma redução na imunomarcação para a enzima 3β HSD (Figura 2a-b) e queda da expressão gênica das principais enzimas da via esteroidogênica (*Star*, *Cyp 11*, *3 β hsd* e *17 β hsd*) ($p < 0.05$; Figura 2c). Os animais infectados ainda apresentaram diminuição significativa dos níveis plasmáticos e intratesticulares de testosterona (Figura 2d-e; $p < 0.05$). Ademais, enquanto a expressão do receptor para *Lh* se encontra reduzido nos animais infectados ($p < 0.05$; Figura 2c), os níveis observados para *Ar* são similares ao grupo controle ($p > 0.05$; Figura 2c).

Observamos uma redução na quantidade de macrófagos no parênquima testicular por meio de imunohistoquímica para CD68 (Figura 2f-g). Os testículos dos animais infectados apresentaram um aumento significativo nos níveis de expressão de *Cox-2* e diminuição dos níveis de *Inos* ($p < 0.05$; Figura 2h). Em contrapartida, a expressão de *Tnf* foi semelhante ao grupo controle ($p > 0.05$; Figura 2h).

5.3. As células de Sertoli são as mais afetadas pela infecção de ZIKV no compartimento tubular

Células de Sertoli dos animais infectados tiveram reduções na imunomarcação (Figura 3a-b) e expressão de *Conexina 43*, proteínas presentes em junções de comunicação ($p < 0.05$; Figura 3c). Diferentemente, a *Claudina 11*, presente em junções de oclusão, não esteve alterada nos animais infectados

($p > 0.05$; Figura 3c). Ainda, podemos notar que a comunicação entre as células de Leydig e de Sertoli encontra-se prejudicada, uma vez que a expressão gênica de *Wt1* está reduzida no grupo infectado ($p < 0.05$; Figura 3c). Os níveis de fatores anti-inflamatórios (*Il-10*) e do citoesqueleto da célula de Sertoli (*Katnal1*) não estiveram alterados nos animais infectados ($p > 0.05$; Figura 3c).

A expressão de *Caspase-3* foi semelhante entre os grupos e em relação às células germinativas, não observamos diferenças quanto à expressão de *Stra 8* (proteína envolvida com o início da fase meiótica) ($p > 0.05$; Figura 3d) e *Vasa* (proteína com alta expressão em espermatogônias e espermatócitos primários) ($p > 0.05$; Figura 3d).

5.4. ZIKV altera a morfologia e a integridade da cromatina nos espermatozoides

Em relação aos parâmetros espermáticos, não identificamos alterações na proporção de espermatozoides vivos e mortos e na motilidade espermática ($p > 0.05$, Figura 4a-b). Considerando os aspectos morfológicos, vimos que os espermatozoides dos animais infectados apresentaram mais defeitos quando comparado com o grupo controle ($p < 0.05$; Figura 4c). As alterações na cabeça do espermatozoide foram as mais prevalentes quando comparado ao controle ($p < 0.05$; Figura 4d). Os defeitos de peça intermediária e cauda foram semelhantes entre os grupos (Figura 4d).

Ao detalharmos as alterações da cabeça do espermatozoide, observamos que os defeitos no acrossomo (*hookless*) foram predominantes no grupo infectado ($p < 0.05$; Figura 4e). Os demais parâmetros morfológicos dos espermatozoides do grupo infectado não evidenciaram diferenças relevantes ($p > 0.05$; Figura 4e).

As análises sobre as alterações na cromatina, por meio da coloração com Azul de Anilina, indicaram aumento significativo (três vezes) em falhas no processo de protaminação dos espermatozoides dos animais infectados ($p < 0.05$; Figura 4f). De modo similar, a coloração com Laranja de Acridina indicou maior fragmentação no DNA espermático nos espermatozoides dos animais infectados ($p < 0.05$; Figura 4g).

De acordo com os dados da inteligência artificial e modelagem dos dados, foi possível perceber a diferenciação do fluido espermático dos animais infectados e controles, com eficiência acima de 89% (Figura 4h). O software e algoritmo utilizados foram eficientes no estabelecimento de diagnóstico nas amostras do fluido seminal (amostras 1 a 22, Figura 4i). A precisão para se chegar ao diagnóstico correto foi acima de 85% em todas as leituras, com média de 93% (barras vermelhas, Figura 4i).

6. DISCUSSÃO

Diversos estudos já haviam demonstrado a presença e o impacto da infecção por ZIKV na biologia reprodutiva masculina, (Camargos et al. 2019; Kurscheidt et al. 2019; Mlakar et al. 2016; Petersen, Meaney-Delman, et al. 2016). Contudo, o presente trabalho foi o primeiro a se investigar a fundo as alterações causadas pelo ZIKV no testículo e em espermatozoides de animais adultos nascidos de mães infectadas durante a gestação. Dentre os principais achados, cabe ressaltar que os indivíduos infectados apresentaram proteínas virais (NS1) em diferentes tipos celulares no parênquima testicular. As expressões dos genes da via esteroidogênica, bem como os níveis de testosterona plasmáticos e intratesticulares, estão reduzidos nesses animais. A infecção viral também teve impactos negativos em células de Sertoli e células germinativas, resultando em alterações espermáticas. Foi observado maior prevalência de espermatozoides morfologicamente anormais com defeitos de cabeça, falhas no processo de protaminação e elevadas taxas de fragmentação de DNA. Em conjunto, os dados presentes realçam um importante alerta para potenciais riscos de problemas de fertilidade a serem manifestados em indivíduos que tenham nascidos de mães infectadas por ZIKV durante a gestação (Figura 5).

No compartimento intertubular, as principais células que apresentaram a proteína não estrutural do ZIKV (NS1) foram as células de Leydig. Apesar de não observarmos muitas diferenças morfológicas em células de Leydig (Camargos et al. 2019), percebemos que a infecção impacta drasticamente o processo esteroidogênico e, conseqüentemente, a produção de testosterona. Esse achado corrobora a redução do volume testicular e menor índice anogenital dos animais nascidos das mães infectadas. Acreditamos que a menor exposição de testosterona na janela de masculinização (fase fetal) pode ter resultado no menor índice anogenital (Mcintyre, Barlow, and Foster 2001). Devemos considerar que as células de Leydig podem estar comprometidas pelo efeito direto (presença do vírus) ou indireto (pela alteração no eixo Hipotálamico-Hipófisário-Gonadal) da infecção viral.

A queda significativa dos níveis de testosterona pode ter levado a alterações na terceira fase da espermatogênese (fase espermiogênica), que é

altamente dependente de andrógenos (Gendt et al. 2004), levando a problemas morfológicos na cabeça dos espermatozoides e na formação do acrossomo. Ainda, a testosterona estimula a produção do fator inibidor de migração de macrófagos (MIF) pelas células de Leydig, que tem a função de recrutar de macrófagos para o ambiente tecidual (Oliveira, Cerri, and Sasso-Cerri 2021). Assim, os níveis reduzidos de testosterona podem contribuir para a redução na quantidade de macrófagos no ambiente testicular. Por sua vez, os próprios macrófagos ainda são importantes fornecedores de colesterol (25 hidroxicolesterol) para as células de Leydig, imprescindíveis para a produção de testosterona (Oliveira et al. 2021).

Os macrófagos são conhecidos como disseminadores de ZIKV na gônada masculina (Yang et al. 2020). Interessantemente, observamos um menor número de macrófagos testiculares (células CD68+) e menor expressão de *iNOS* no tecido testicular dos animais infectados. A menor expressão de *iNOS* também pode levar a uma menor produção de testosterona pelas células de Leydig (O'bryan et al. 2000). Ainda, observamos um aumento da expressão de *Cox-2* no testículo dos animais infectados. Geralmente, essa expressão ocorre em macrófagos, células de Leydig e em células de Sertoli (Nica B Frungieri et al. 2015). Os níveis aumentados de *Cox-2* podem coibir a infiltração de macrófagos (Wang et al. 2021), inibir a síntese de testosterona (Zirkin 2005) e as prostaglandinas produzidas (principalmente PGE2) podem estimular a replicação de vírus com fita de RNA positiva (Waris and Siddiqui 2005), como observado para o ZIKV. Ao avaliarmos a expressão de uma molécula anti-inflamatória (*Il10*) e pró-inflamatória (*Tnf*), vimos que estavam semelhantes às dos animais controles. Esses dados sugerem que o ambiente testicular dos animais infectados não estava inflamado, o que é condizente com a produção contínua de espermatozoides nesses animais.

No compartimento tubular, as células que apresentaram mais susceptibilidade ao vírus foram as células de Sertoli e as células germinativas localizadas no compartimento basal. Curiosamente, apoptose de espermatócitos primários já foi reportado em estudos anteriores usando esse mesmo modelo de infecção (Camargos et al. 2019). Percebemos nesse modelo que a sinalização

entre as células de Sertoli adjacentes e entre as células de Sertoli e células de Leydig estiveram comprometidas, uma vez que observamos menores níveis da expressão de *Conexina 43* (presentes em junções de comunicação) e *Wt1* (fator produzido pelas células de Sertoli que estimula a esteroidogênese em células de Leydig)(Chen et al. 2014). Interessantemente, vimos que a expressão de *Claudina 11* (presente em junções de oclusão) esteve semelhante aos animais controles, indicando que a barreira de células de Sertoli estava preservada nesses animais. Esses dados são condizentes com a formação de células haplóides no compartimento tubular. Devido a alteração da morfologia espermática e observações prévias de retenção de corpos residuais (Camargos et al. 2019), investigamos a expressão de *Katnal1*, um fator produzido pelas células de Sertoli que é essencial para a espermiogênese e diferenciação das espermátides (Smith et al. 2012). A expressão dessa proteína manteve o mesmo padrão entre o grupo infectado e controle, sugerindo que o citoesqueleto das células de Sertoli não estava afetado pela infecção e pelos baixos níveis androgênicos.

A redução dos níveis de andrógenos no testículo pode desencadear importantes problemas para o processo espermatogênico (SMITH; WALKER, 2014). Sabe-se, também, que falhas na espermatogênese, principalmente relacionadas à organização da cromatina, estão diretamente associadas com o aumento dos defeitos de cabeça nos espermatozoides (Chemes and Rawe 2003). Deste modo, o aumento significativo da proporção de espermatozoides com defeitos de cabeça, bem como a maior prevalência de gametas com a cromatina não-protaminada, observados no grupo infectado do presente trabalho, podem indicar uma potencial condição de subfertilidade (Chemes and Rawe 2003; Pourmasumi et al. 2019).

Além disso, defeitos na formação do acrossomo já foram anteriormente relacionados com o aumento da taxa de fragmentação no DNA e da falha de compactação da cromatina (Chemes and Rawe 2003; Vicari et al. 2002). Os dados aqui apresentados, obtidos pela combinação da análise morfológica e distintas técnicas de coloração/marcação, indicam possíveis danos ao DNA e alterações na formação de acrossomo dos espermatozoides da prole nascida de

mães infectadas por ZIKV durante a gestação. O processo de protaminação, que consiste na substituição de histonas por protaminas no DNA dos espermatozoides, molda a dupla-fita em estruturas toroidais tornando-a mais compacta e protegida contra agentes danosos ao material genético, como endonucleases e radicais livres (Aitken and De Iuliis 2007; Beletti 2013; Carrell 2012). O comprometimento desse processo pode resultar em redução da motilidade espermática e aumento considerável de danos ao DNA (Carrell 2012; Dominguez, Arca, and Ward 2011), sendo amplamente discutidos na literatura como possíveis causadores de infertilidade (Carrell 2012; Oliva 2006; Simon et al. 2011, 2019). Em conjunto, a queda da quantidade de espermatozoides morfológicamente normais somada aos danos na cromatina observados no presente estudo alertam para uma possível condição de subfertilidade nesses indivíduos, uma vez que são necessários gametas vivos, móveis e morfológicamente normais para uma fertilização natural e de sucesso (Chemes and Rawe 2003).

Além da preocupação com a fertilidade, devemos considerar o ejaculado como um importante fluido biológico que indica as condições de saúde da pessoa. Estudos clássicos demonstram que homens com piores parâmetros seminais apresentam maiores taxas de mortalidade (Eisenberg et al. 2014; Jensen et al. 2009). Dessa forma, no presente estudo, identificamos as propriedades dielétricas seminais específicas dos animais controles e infectados. Essa padronização pode ser uma ferramenta valiosa e alternativa de diagnóstico e triagem de pacientes do sexo masculino. Assim, associando leitores espectroscópicos para avaliação do ejaculado e, com o auxílio de inteligência artificial, poderemos ter resultados rápidos e confiáveis, identificando se o paciente foi ou não infectado. A tecnologia diagnóstica proposta é muito promissora pois consegue detectar padrões específicos dos espermatozoides baseado nas mudanças do coeficiente de excitação das amostras. Apesar dos dados serem iniciais e inovadores, dependendo da repetibilidade dos nossos ensaios, poderemos desenvolver protótipos para serem usados em clínicas de reprodução assistida e Unidades Básicas de Saúde.

Ao encontro dos achados descritos no presente trabalho, animais diretamente infectados por ZIKV, além de apresentarem redução drástica dos níveis de testosterona (GOVERO et al., 2016), também exibem alterações importante para o processo espermatogênico bem como maior percentual de espermatozoides com morfologia anormal, assim como elevadas taxas de fragmentação de DNA (Govero et al. 2016; Griffin et al. 2017; Joguet et al. 2017; Kurscheidt et al. 2019; Sheng et al. 2017). Portanto, é fundamental ressaltar que essa condição e risco de comprometimento da fertilidade é válido para indivíduos infectados durante a gestação (modelo do presente estudo).

7. CONCLUSÃO

A partir das investigações realizadas no presente estudo, vimos proteínas virais (NS1) do ZIKV em diferentes tipos celulares no parênquima testicular dos animais nascidos de mães infectadas durante a gestação. Dentre as principais alterações testiculares desses animais, podemos ressaltar o comprometimento da via esteroidogênica e dos níveis plasmáticos e intratesticulares de testosterona. Os baixos níveis androgênicos estão relacionados com o menor índice anogenital identificado nos animais infectados, bem como na maioria das alterações testiculares observadas. Entre as alterações, podemos mencionar a falha na sinalização das células de Leydig com células de Sertoli e com macrófagos. Observamos falhas na fase de diferenciação espermática (que é altamente depende de andrógenos), e, como consequência, identificamos defeitos de cabeça, falhas de protaminação, maior fragmentação do DNA e mudanças das propriedades dielétricas dos espermatozoides. Apesar de serem necessários mais estudos sobre o tema, podemos concluir que as propriedades dielétricas associadas com modelagem de inteligência artificial são promissoras para o estabelecimento de um teste rápido diagnóstico de alterações espermáticas decorrentes de infecção viral.

8. FIGURAS

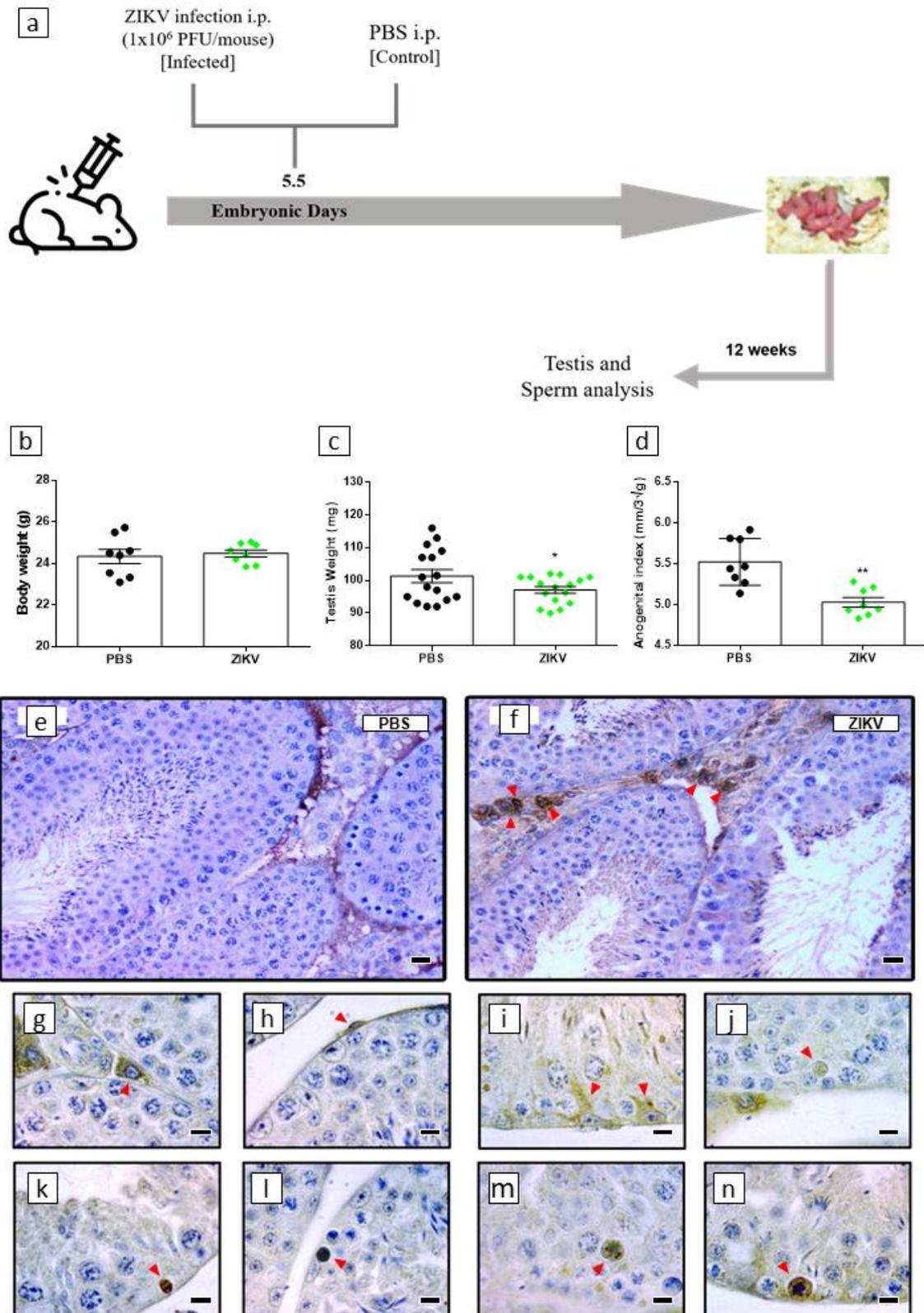


Figura 1. Parâmetros biométricos e presença de proteínas virais nos testículos de indivíduos que nasceram de mães infectadas por ZIKV.

(a) Design experimental: camundongas foram injetadas com PBS (Círculo preto) e com 10^6 PFU da cepa brasileira do ZIKV (Losango verde) no dia 5,5 da gestação. 12 semanas após o nascimento da prole, os animais foram analisados. Esquema modificado de Camargos et al., 2019. (b-d) parâmetros biométricos: (b) peso corporal, (c) peso testicular e (d) índice anogenital em animais controles (PBS) e infectados (ZIKV). (e-m) Proteínas virais identificados no parênquima testicular. (e) Animais controles (PBS). (f-m) Identificação da proteína NS1 (Células positivas: cabeça de seta vermelha) no parênquima testicular de animais infectados (f, ZIKV) e em diferentes tipos celulares, tais como: (g) Célula de Leydig; (h) Célula peritubular mióide; (i) Célula de Sertoli; (j) Pré-leptóteno; (k) Leptóteno; (l) Zigóteno; (m) Paquiteno; (n) Diplóteno. Análise estatística (teste t): * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$. Barra de escala: e-f: $20\mu\text{m}$; g-n: $10\mu\text{m}$.

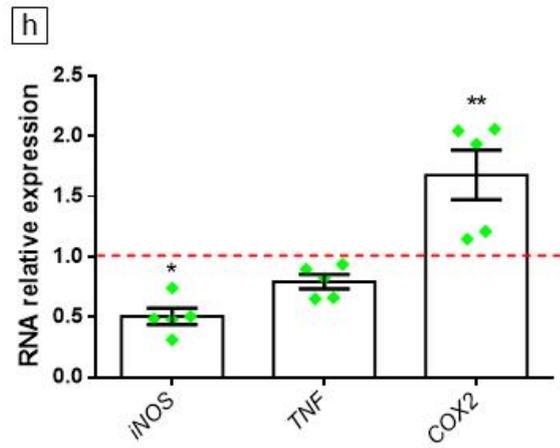
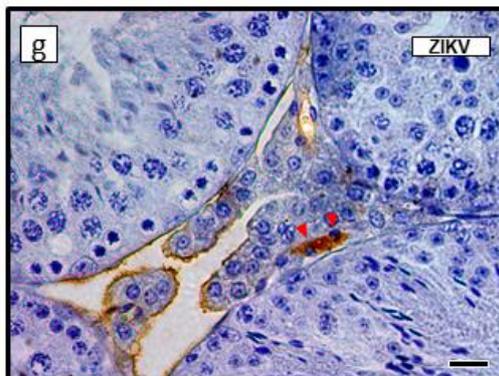
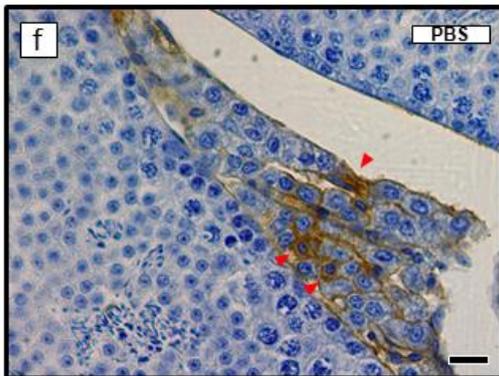
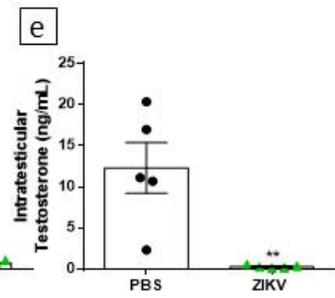
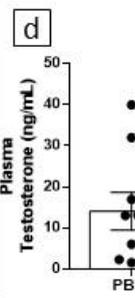
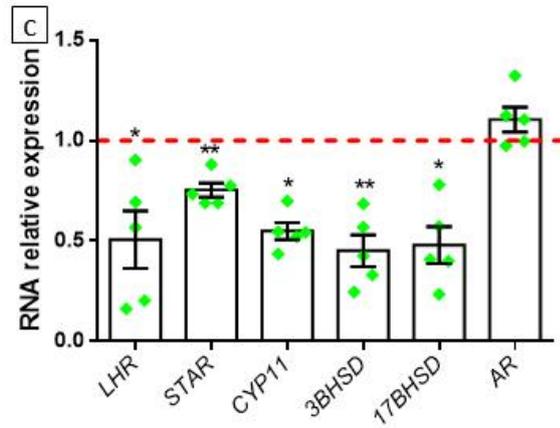
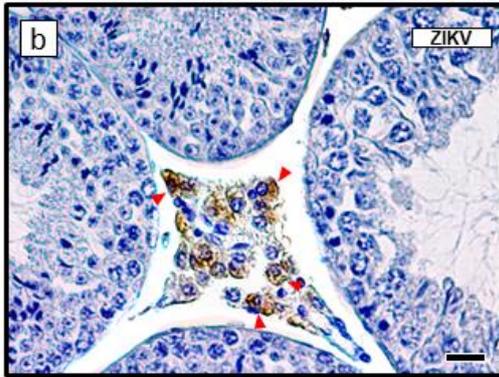
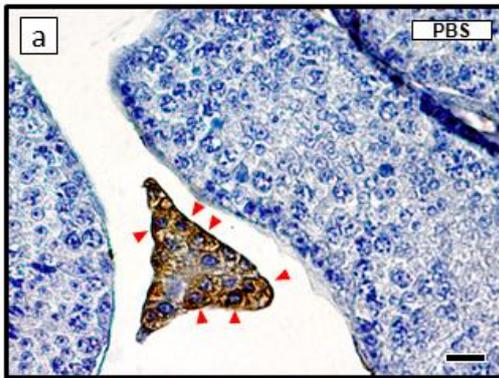


Figura 2. Alterações no compartimento intertubular do testículo da prole infectada.

(a-b) Imunomarcção para a enzima 3β HSD em animais controle (a, PBS) e infectados (b, ZIKV). (c) Análise gênica das enzimas da via esteroidogênica. Linha tracejada indica a expressão do grupo controle. (d-e) Níveis plasmáticos (d) e intratesticulares (e) de testosterona nos grupos controle (PBS) e infectado (ZIKV). (f, g) Imunomarcção para CD68 (cabeça de seta vermelha) nos animais controle (f) e infectados (g). (h) Análise gênica de *inos*, *Tnf* e *Cox2*. Linha tracejada indica a expressão do grupo controle. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Análise estatística (teste t): * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$. Barra de escala: 20 μ m.

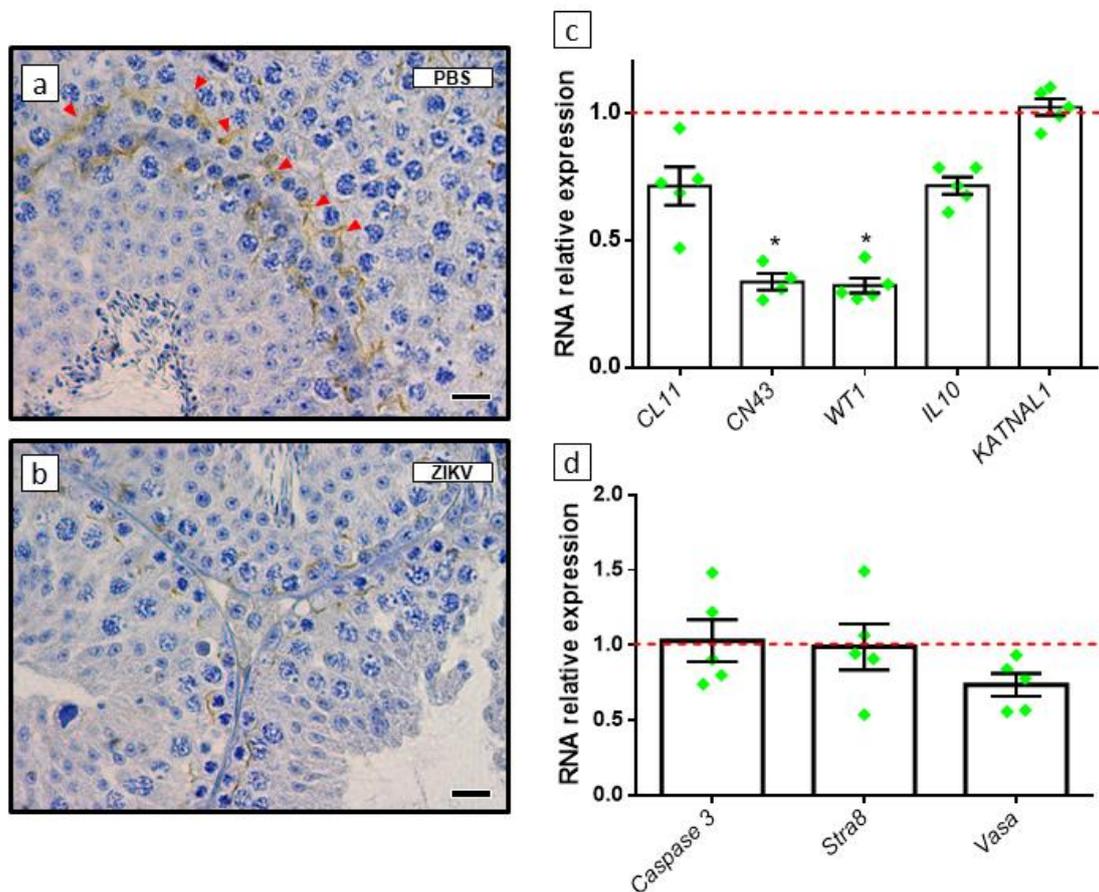


Figura 3. Alterações no compartimento tubular do testículo da prole infectada.

(a, b) Imunohistoquímica para a proteína Conexina 43 (cabeça de seta vermelha) em animais controle (a, PBS) e infectados (b, ZIKV). (c) Análise de importantes genes expressos em células de Sertoli. Linha tracejada indica a expressão do grupo controle. (d) Análise de genes relacionados com morte celular e células germinativas. Linha tracejada indica a expressão do grupo controle. Análise estatística (teste t): * = $p < 0.05$. Barra de escala: 20 μ m.

Figura 4. Parâmetros espermáticos dos camundongos nascidos de mães infectadas por ZIKV.

(a) A vitalidade espermática no grupo controle (PBS) e infectado (ZIKV). (b) Motilidade total e progressiva dos espermatozoides do grupo controle (PBS) e infectado (ZIKV). (c) Prevalência de espermatozoides morfologicamente normais no grupo controle (PBS) e infectado (ZIKV). (d) Localização das principais alterações morfológicas do espermatozoide (*cabeça-head*, *peça intermediária-midpiece* e *cauda-tail*) no grupo controle (preto) e infectado (verde). (e) Detalhamento da prevalência das alterações morfológicas na cabeça dos espermatozóides (*acrossoma-hookless*; formato de banana- *banana like*; estreito-*narrow*; sem *cabeça-headless*; amorfo-*amorphous*; duas cabeças-*double head*). (f) Quantificação dos espermatozoides com DNA não protaminado nos grupos controle (PBS) e infectado (ZIKV). (g) Quantificação dos espermatozoides com DNA fragmentado no grupo controle (PBS) e infectado (ZIKV). (h) Classificação dos dados espectroscópicos do sêmen dos diferentes grupos amostrais pelo software de Inteligência Artificial. (i) Probabilidade de infecção fornecida pelo software ao interpretar os dados espectroscópicos do sêmen infectado com Zika vírus (amostras 1 a 22). Amostra (*sample*) 0 = probabilidade diagnóstica do software antes da leitura do fluido seminal. Barras vermelhas = probabilidade do sêmen ser do animal infectado. Barra azul = probabilidade do sêmen ser do animal controle. Análise estatística: a, f e g (teste Mann-Whitney); b-e (teste t); * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0,001$.

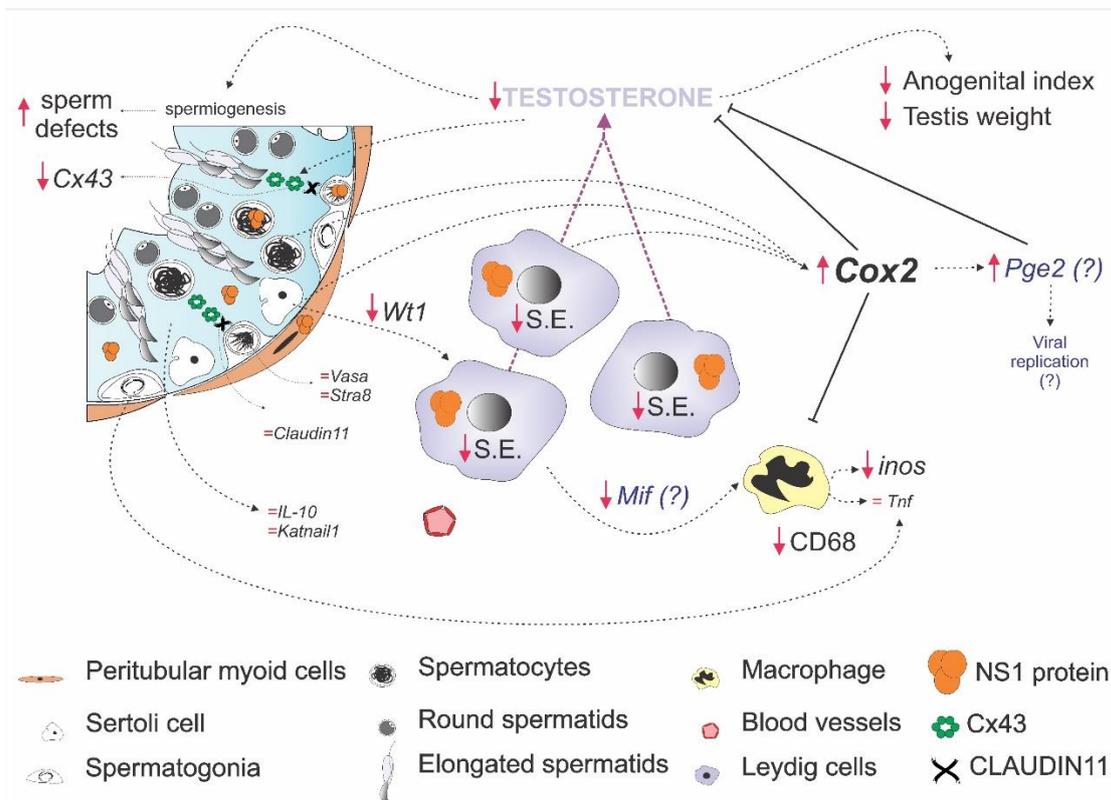


Figura 5. Resumo e hipótese da patogênese de ZIKV em testículos de camundongos infectados durante a gestação.

Proteínas do ZIKV (NS1) foram identificadas em células de Leydig, células peritubulares mióides, células de Sertoli e células germinativas. Os dados sugerem que a possível infecção de ZIKV em células de Leydig é crítica para induzir alterações biométricas, celulares e moleculares observadas nos testículos de animais nascidos de mães infectadas. Células de Leydig infectadas diminuem a síntese de testosterona devido a inibição das enzimas esteroidogênicas (S.E.), resultando em menor peso testicular e índice anogenital. Os níveis baixos de andrógenos podem afetar a fase espermiogênica, responsável pela diferenciação morfológica das espermátides. Ainda, células de Leydig infectadas podem estimular a síntese de COX2 e inibir o recrutamento de macrófagos (CD68+). Os níveis de MIF (macrophage migration inhibitory factor), envolvida na atração de macrófagos, e PGE2 (prostaglandinas E2) que inibe a síntese de testosterona e estimula a replicação de viral estão sob investigação. No compartimento tubular, reduzidas

sinalizações entre células de Sertoli (conexina 43, Cx43) e entre células de Sertoli e Leydig (Wt1) foram evidenciadas. Setas tracejadas: vias estimulatórias. Linhas contínuas: vias inibitórias. Setas para baixo: redução ou menor expressão. Setas para cima: aumento ou maior expressão. Sinal de igual: expressão inalterada.

9. REFERÊNCIAS

- Abd-Elmoaty, Mohamed Ahmed, Ramadan Saleh, Rakesh Sharma, and Ashok Agarwal. 2010. "Increased Levels of Oxidants and Reduced Antioxidants in Semen of Infertile Men with Varicocele." *Fertility and Sterility* 94(4):1531–34. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.12.039.
- Abou-Setta, Ahmed M., Ragaa T. Mansour, Hesham G. Al-Inany, Mona A. Aboulghar, Ahmed Kamal, Mohamed A. Aboulghar, and Gamal I. Serour. 2006. "Intrauterine Insemination Catheters for Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Human Reproduction* 21(8):1961–67. doi: 10.1093/humrep/del139.
- Abrahamsohn, Paulo Alexandre. 2013. "Aparelho Reprodutor Masculino." Pp. 413–26 in *Histologia Básica*, edited by L. C. U. Junqueira and J. Carneiro.
- Agarwal, Ashok, Aditi Mulgund, Saad Alshahrani, Mourad Assidi, Adel M. Abuzenadah, Rakesh Sharma, and Edmund Sabanegh. 2014. "Reactive Oxygen Species and Sperm DNA Damage in Infertile Men Presenting with Low Level Leukocytospermia." *Reproductive Biology and Endocrinology* 12(1):1–8. doi: 10.1186/1477-7827-12-126.
- Aitken, John, and Helen Fisher. 1994. "Reactive Oxygen Species Generation and Human Spermatozoa: The Balance of Benefit and Risk." *BioEssays* 16(4):259–67. doi: 10.1002/bies.950160409.
- Aitken, R. John, and Geoffry N. De Luliis. 2007. "Origins and Consequences of DNA Damage in Male Germ Cells." *Reproductive BioMedicine Online* 14(6):727–33. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60676-1.
- American Society for Reproductive Medicine - ASRM. n.d. "Assisted Reproductive Technologies | ASRM."
- Anifandis, G., · T Bounartzi, · C I Messini, · K Dafopoulos, · S Sotiriou, and I. E. Messinis. 2014. "The Impact of Cigarette Smoking and Alcohol Consumption on Sperm Parameters and Sperm DNA Fragmentation (SDF) Measured by Halosperm ®." *Gynecologic Endocrinology and Reproductive Medicine* 29(4):777–82. doi: 10.1007/s00404-014-3281-x.

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2011. “Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 23, de 27 de Maio de 2011.”
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2020. “Consulta Pública Nº 990, de 21 de Dezembro de 2020.”
- Araújo Filho, Edilberto, Cássio Leão Fácio, Ligiane Alves Machado-Paula, Mariana Angelozzi de Oliveira, Ciro Dresch Martinhago, Leonardo Previato Araújo, and Lígia Fernanda P. Araújo. 2019. “Case Report Case Report of Zika Virus during Controlled Ovarian Hyperstimulation: Results from Follicular Fluid, Cumulus Cells and Oocytes.” *JBRA Assisted Reproduction* 23(2):172–74. doi: 10.5935/1518-0557.20180081.
- Arsuaga, Marta, Silvia García Bujalance, Marta Díaz-Menéndez, Ana Vázquez, and Jose R. Arribas. 2016. “Probable Sexual Transmission of Zika Virus from a Vasectomised Man.” *The Lancet Infectious Diseases* 16(10):1107. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30320-6.
- Atkinson, Barry, Pasco Hearn, Babak Afrough, Sarah Lumley, Daniel Carter, Emma J. Aarons, Andrew J. Simpson, Timothy J. Brooks, and Roger Hewson. 2016. “Detection of Zika Virus in Semen.” *Emerging Infectious Diseases* 22(5):940. doi: 10.3201/eid2205.160107.
- Auharek, S. A., N. L. M. M. Lara, G. F. Avelar, R. M. Sharpe, and L. R. França. 2012. “Effects of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Deficiency in Mice on Sertoli Cell Proliferation and Perinatal Testis Development.” *International Journal of Andrology* 35(5):741–51. doi: 10.1111/j.1365-2605.2012.01264.x.
- Bagasra, Omar, and Krishna C. Addanki. 2017. “Cellular Targets and Receptor of Sexual Transmission of Zika Virus.” *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 25(10):679–86. doi: 10.1097/PAI.0000000000000580.
- Bagasra, Omar, Krishna C. Addanki, Gregory R. Goodwin, Brandon W. Hughes, Pratima Pandey, and Ewen McLean. 2017. “Cellular Targets and Receptor of Sexual Transmission of Zika Virus.” *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 25(10):679–86. doi:

10.1097/PAI.0000000000000580.

- Ball, G. David, Nabal Bracero, Maria Bustillo, Owen Davis, Susan Gitlin, Avner Hershlag, William Hurd, Jennifer Kawwass, Samantha Pfeifer, Richard Reindollar, James Segars, Sean Tipton, Bradley Van Voorhis, and Michael Vernon. 2016. "Guidance for Providers Caring for Women and Men of Reproductive Age with Possible Zika Virus Exposure." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 65(12):315–22. doi: 10.15585/mmwr.mm6512e2. PMID: 27031943.
- Barzon, L., M. Pacenti, E. Franchin, E. Lavezzo, M. Trevisan, D. Sgarabotto, and G. Palù. 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). doi: 10.2807/1560-7917.
- Barzon, Luisa, Elena Percivalle, Monia Pacenti, Francesca Rovida, Maurizio Zavattoni, Paola Del Bravo, Anna Maria Cattelan, Giorgio Palù, and Fausto Baldanti. 2018. "Virus and Antibody Dynamics in Travelers with Acute Zika Virus Infection." *Clinical Infectious Diseases* 66(8):1173–80. doi: 10.1093/cid/cix967.
- Baud, David, Didier Musso, Manon Vouga, Marco P. Alves, and Nicolas Vulliamoz. 2017. "Zika Virus: A New Threat to Human Reproduction." *American Journal of Reproductive Immunology* 77(2):1–13. doi: 10.1111/aji.12614.
- Beletti, M. 2013. "Cromatina Espermática: Quebrando Paradigmas." *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 37(2):92–96.
- Besnard, M., S. Lastère, A. Teissier, V. M. Cao-Lormeau, and D. Musso. 2014. "Evidence of Perinatal Transmission of Zika Virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014." *Euro Surveill* 19(13):8–11. doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751.
- Borges, E. D., A. A. Vireque, T. S. Berteli, C. R. Ferreira, A. S. Silva, and P. A. Navarro. 2019. "An Update on the Aspects of Zika Virus Infection on Male Reproductive System." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 36(7):1339–49. doi: 10.1007/s10815-019-01493-y.

- Brasil, Ministério da Saúde. 2020. “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Para Atenção Às Pessoas Com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST).” *Secretaria de Vigilância Em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis* (0014125063):1–248.
- Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde –. Ministério da Saúde do Brasil. 2021. “Boletim Epidemiológico. Monitoramento Dos Casos de Arboviroses Urbanas Transmitidas Pelo Aedes (Dengue, Chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 47, 2021.” *Boletim Epidemiológico Arboviroses* 52(24):1–13.
- Brehm, Ralph, Martina Zeiler, Christina Rüttinger, Katja Herde, Mark Kibschull, Elke Winterhager, Klaus Willecke, Florian Guillou, Charlotte Lécureuil, Klaus Steger, Lutz Konrad, Katharina Biermann, Klaus Failing, and Martin Bergmann. 2007. “A Sertoli Cell-Specific Knockout of Connexin43 Prevents Initiation of Spermatogenesis.” *American Journal of Pathology* 171(1):19–31. doi: 10.2353/ajpath.2007.061171.
- Camargos, Vidyleison N., Giselle Foureaux, Daniel C. Medeiros, Vivian T. da Silveira, Celso M. Queiroz-Junior, Ana Luisa B. Matosinhos, André F. A. Figueiredo, Carla D. F. Sousa, Thaiane P. Moreira, Victória F. Queiroz, Ana Carolina F. Dias, Karina T. O. Santana, Ingredy Passos, Ana Luíza C. V. Real, Ludmila C. Silva, Flávio A. G. Mourão, Natália T. Wnuk, Milton A. P. Oliveira, Soraia Macari, Tarcília Silva, Gustavo P. Garlet, Joshua A. Jackman, Frederico M. Soriani, Márcio F. D. Moraes, Eduardo M. A. M. Mendes, Fabíola M. Ribeiro, Guilherme M. J. Costa, Antônio L. Teixeira, Nam Joon Cho, Antônio C. P. Oliveira, Mauro M. Teixeira, Vivian V. Costa, and Danielle G. Souza. 2019. “In-Depth Characterization of Congenital Zika Syndrome in Immunocompetent Mice: Antibody-Dependent Enhancement and an Antiviral Peptide Therapy.” *EBioMedicine* 44:516–29. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.014.
- Campos, Gubio S., Antonio C. Bandeira, and Silvia I. Sardi. 2015. “Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil.” *Emerging Infectious Diseases* 21(10):1885–86. doi: 10.3201/eid2110.150847.

- Carrell, Douglas T. 2012. "Epigenetics of the Male Gamete." *Fertility and Sterility* 97(2):267–74. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.12.036.
- Centers for Disease Control and Prevention - CDC. n.d. "What Is Assisted Reproductive Technology? | Reproductive Health | CDC."
- Cerbino-neto, José, Emersom Cicilini Mesquita, Bernardo Bastos Wittlin, Betina Durovni, Maria Cristina, Ferreira Lemos, Alexandre Vizzoni, Ana Maria, Bispo De Filippis, Simone Alves Sampaio, Bianca De Santis Gonçalves, and Fernando A. Bozza. 2016. "Clinical Manifestations of Zika Virus Infection , Rio de Janeiro , Brazil , 2015." *Emerging Infectious Diseases* 22(7):1318–20. doi: 10.3201/eid2207.160375.
- Chemes, Hector E., and Vanesa Y. Rawe. 2003. "Sperm Pathology: A Step beyond Descriptive Morphology. Origin, Characterization and Fertility Potential of Abnormal Sperm Phenotypes in Infertile Men." *Human Reproduction Update* 9(5):405–28. doi: 10.1093/humupd/dmg034.
- Chen, Min, Xiaona Wang, Yanbo Wang, Lianjun Zhang, Binyang Xu, Limin Lv, Xiuhong Cui, Wei Li, and Fei Gao. 2014. "Wt1 Is Involved in Leydig Cell Steroid Hormone Biosynthesis by Regulating Paracrine Factor Expression in Mice 1." *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 90(4):71–72. doi: 10.1095/biolreprod.113.114702.
- Cheng, C. Yan, and Dolores D. Mruk. 2010. "A Local Autocrine Axis in the Testes That Regulates Spermatogenesis." *Nature Reviews Endocrinology* 6(7):380–95. doi: 10.1038/nrendo.2010.71.
- Coordenação-Geral de Vigilância das Arboviroses do Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis (CGARB/DEIDT/SVS), and Coordenação-Geral de Laboratório de Saúde Pública do Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde (CGLAB/DAEVS/SVS). 2020. "Monitoramento Dos Casos de Arboviroses Urbanas Transmitidas Pelo Aedes Aegypti (Dengue, Chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 50, 2020." *Secretaria de Vigilância Em Saúde \ Ministério Da Saúde* 51(Tabela 1):1–33.
- Cordeiro, Christina N., Rashda Bano, Chantel I. Washington Cross, and James

- H. Segars. 2017. "Zika Virus and Assisted Reproduction." *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 29(3):175–79. doi: 10.1097/GCO.0000000000000366.
- Coutinho, Raquel Zanatta, Aida Villanueva Montalvo, Abigail Weitzman, and Letícia Junqueira Marteleto. 2021. "Zika Virus Public Health Crisis and the Perpetuation of Gender Inequality in Brazil." *Reproductive Health* 18(1):1–21. doi: 10.1186/s12978-021-01067-1.
- Dégallier, N., J. M. Teixeira, P. D. Vilarinhos, S. C. Pinto, and R. D. Pereira. 2000. "First Isolation of Dengue 1 Virus from *Aedes Aegypti* in Federal District, Brazil." *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33(1):95–96. doi: 10.1590/S0037-86822000000100016.
- Dejucq, Nathalie, and Bernard Jégou. 2001. "Viruses in the Mammalian Male Genital Tract and Their Effects on the Reproductive System." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(2):208–31. doi: 10.1128/mnbr.65.2.208-231.2001.
- Dick, G. W. A., S. F. Kitchen, and A. J. Haddow. 1952. "Zika Isolation and Serological Specificity." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 46(5):509–20. doi: 10.1016/0035-9203(52)90042-4.
- Dominguez, Kenneth, Chris Arca, and W. Steven Ward. 2011. "The Relationship Between Chromatin Structure and DNA Damage in Mammalian Spermatozoa." Pp. 61–68 in *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. Springer.
- Duarte, Geraldo, Angélica Espinosa Miranda, Ximena Pamela Díaz Bermúdez, Valeria Saraceni, and Flor Ernestina Martínez-Espinosa. 2021. "Protocolo Brasileiro Para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: Infecção Pelo Vírus Zika." *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 30(spe1):1–12. doi: 10.1590/s1679-4974202100017.esp1.
- Duffy, Mark R., Tai-Ho Chen, W. Thane Hancock, Ann M. Powers, Jacob L. Kool, Robert S. Lanciotti, Moses Pretrick, Maria Marfel, Stacey Holzbauer, Christine Dubray, Laurent Guillaumot, Anne Griggs, Martin Bel, Amy J. Lambert, Janeen Laven, Olga Kosoy, Amanda Panella, Brad J. Biggerstaff,

- Marc Fischer, and Edward B. Hayes. 2009. "Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia." *The New England Journal of Medicine* 360(24):2536–43. doi: 10.1056/NEJMoa0805715.
- Duggal, Nisha K., Jana M. Ritter, Samuel E. Pestorius, Sherif R. Zaki, Brent S. Davis, Gwong Jen J. Chang, Richard A. Bowen, and Aaron C. Brault. 2017. "Frequent Zika Virus Sexual Transmission and Prolonged Viral RNA Shedding in an Immunodeficient Mouse Model." *Cell Reports* 18(7):1751–60. doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.056.
- Dym, M., and D. W. Fawcett. 1970. "The Blood-Testis Barrier in the Rat and the Physiological Compartmentation of the Seminiferous Epithelium." *Biology of Reproduction* 3(3):308–26. doi: 10.1093/biolreprod/3.3.308.
- Eisenberg, Michael L., Shufeng Li, Barry Behr, Mark R. Cullen, Deron Galusha, Dolores J. Lamb, and Larry I. Lipshultz. 2014. "Semen Quality, Infertility and Mortality in the USA." *Human Reproduction* 29(7):1567–74. doi: 10.1093/humrep/deu106.
- Esteves, Sandro C., Armand Zini, Robert Matthew Coward, Donald P. Evenson, Jaime Gosálvez, Sheena E. M. Lewis, Rakesh Sharma, and Peter Humaidan. 2021. "Sperm DNA Fragmentation Testing: Summary Evidence and Clinical Practice Recommendations." *Andrologia* 53(2):e13874. doi: 10.1111/and.13874.
- Ezer, Nadine, and Bernard Robaire. 2002. "Androgenic Regulation of the Structure and Functions of the Epididymis." *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice* (January 2002):197–316. doi: 10.1007/978-1-4615-0679-9.
- Feinberg, Eve C. 2017. "Advances in Cryopreservation: We Are Not Frozen in Time." *Fertility and Sterility* 108(5):763. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.08.028.
- Fietz, D., and M. Bergmann. 2017. "Functional Anatomy and Histology of the Testis." Pp. 1–29 in *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction. Endocrinology.*, edited by M. Simoni and I. Huhtaniemi. Springer, Cham.

- Fijak, Monika, Sudhanshu Bhushan, and Andreas Meinhardt. 2011. "Immunoprivileged Sites: The Testis Monika." Pp. 459–70 in *Suppression and Regulation of Immune Responses*. Vol. 677, edited by M. C. Cuturi and I. Anegon.
- Foy, Brian D., Kevin C. Kobylinski, Joy L. Chilso. Foy, Bradley J. Blitvich, Amelia Travassos da Rosa, Andrew D. Haddow, Robert S. Lanciotti, and Robert B. Tesh. 2011. "Probable Non-Vector-Borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA." *Emerging Infectious Diseases* 17(5):880–82. doi: 10.3201/eid1705.101939.
- Froeschl, Guenter, Kristina Huber, Frank von Sonnenburg, Hans Dieter Nothdurft, Gisela Bretzel, Michael Hoelscher, Lothar Zoeller, Matthias Trottmann, Francisco Pan-Montojo, Gerhard Dobler, and Silke Woelfel. 2017. "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(1). doi: 10.1186/s12879-016-2123-9.
- Gendt, Karel De, Johannes V. Swinnen, Philippa T. K. Saunders, Luc Schoonjans, Mieke Dewerchin, Ann Devos, Karen Tan, Nina Atanassova, Frank Claessens, Charlotte Lécureuil, Walter Heyns, Peter Carmeliet, Florian Guillou, Richard M. Sharpe, and Guido Verhoeven. 2004. "A Sertoli Cell-Selective Knockout of the Androgen Receptor Causes Spermatogenic Arrest in Meiosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(5):1327–32. doi: 10.1073/PNAS.0308114100/SUPPL_FILE/08114FIG4.JPG.
- Gil-Guzman, E., M. Ollero, M. C. Lopez, R. K. Sharma, J. G. Alvarez, A. J. Thomas, and A. Agarwal. 2001. "Differential Production of Reactive Oxygen Species by Subsets of Human Spermatozoa at Different Stages of Maturation." *Human Reproduction* 16(9):1922–30. doi: 10.1093/humrep/16.9.1922.
- Gogia, Atul, and Atul Kakar. 2016. "Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro." *Current Medicine Research and Practice* 6(2):95. doi: 10.1016/j.cmrp.2016.03.003.

- Gornet, Megan E., Nabal J. Bracero, and James H. Segars. 2016. "Zika Virus in Semen: What We Know and What We Need to Know." *Seminars in Reproductive Medicine* 34(5):285–92. doi: 10.1055/s-0036-1592312.
- Govero, Jennifer, Prabakaran Esakky, Suzanne M. Scheaffer, Estefania Fernandez, Andrea Drury, Derek J. Platt, Matthew J. Gorman, Justin M. Richner, Elizabeth A. Caine, Vanessa Salazar, Kelle H. Moley, and Michael S. Diamond. 2016. "Zika Virus Infection Damages the Testes in Mice." *Nature* 2016 540:7633 540(7633):438–42. doi: 10.1038/nature20556.
- Gow, Alexander, Cherie M. Southwood, Jing Song Li, Milena Pariali, Gavin P. Riordan, Scott E. Brodie, John Danias, Jeff M. Bronstein, Bechara Kachar, and Robert A. Lazzarini. 1999. "CNS Myelin and Sertoli Cell Tight Junction Strands Are Absent in OSP/Claudin-11 Null Mice." *Cell* 99(6):649–59. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81553-6.
- Griffin, Bryan D., Kar Muthumani, Bryce M. Warner, Anna Majer, Mable Hagan, Jonathan Audet, Derek R. Stein, Charlene Ranadheera, Trina Racine, Marc Antoine De La Vega, Jocelyne Piret, Stephanie Kucas, Kaylie N. Tran, Kathy L. Frost, Christine De Graff, Geoff Soule, Leanne Scharikow, Jennifer Scott, Gordon McTavish, Valerie Smid, Young K. Park, Joel N. Maslow, Niranjana Y. Sardesai, J. Joseph Kim, Xiao Jian Yao, Alexander Bello, Robbin Lindsay, Guy Boivin, Stephanie A. Booth, Darwyn Kobasa, Carissa Embury-Hyatt, David Safronetz, David B. Weiner, and Gary P. Kobinger. 2017. "DNA Vaccination Protects Mice against Zika Virus-Induced Damage to the Testes." *Nature Communications* 8(1):1–8. doi: 10.1038/ncomms15743.
- Gulland, Anne. 2016a. "WHO Urges Countries in Dengue Belt to Look out for Zika." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 352(January):i595. doi: 10.1136/bmj.i595.
- Gulland, Anne. 2016b. "Zika Virus Is a Global Public Health Emergency, Declares WHO." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 352(February):i657. doi: 10.1136/bmj.i657.
- Hamel, Rodolphe, Ophélie Dejarnac, Sineewanlaya Wichit, Peeraya

- Ekchariyawat, Aymeric Neyret, Natthanej Luplertlop, Manuel Perera-Lecoin, Pornapat Surasombatpattana, Loïc Talignani, Frédéric Thomas, Van-Mai Cao-Lormeau, Valérie Choumet, Laurence Briant, Philippe Desprès, Ali Amara, Hans Yssel, and Dorothee Missé. 2015. "Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells." *Journal of Virology* 89(17):8880–96. doi: 10.1128/JVI.00354-15.
- Hayes, Edward B. 2009. "Zika Virus Outside Africa." *Emerging Infectious Diseases* 15(9):1347–50. doi: 10.3201/eid1509.090442.
- Hess, Rex A., David Bunick, Dennis B. Lubahn, Qing Zhou, and Jerry Bouma. 2000. "Morphologic Changes in Efferent Ductules and Epididymis in Estrogen Receptor- α Knockout Mice." *Journal of Andrology* 21(1):107–21. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03282.x.
- Hess, Rex A., Sheilla A. F. Fernandes, Gisele R. O. Gomes, Cleida A. Oliveira, Maria F. M. Lazari, and Catarina S. Porto. 2011. "Estrogen and Its Receptors in Efferent Ductules and Epididymis." *Journal of Andrology* 32(6):600–613. doi: 10.2164/jandrol.110.012872.
- Hess, Rex A., and Luiz R. França. 2005. "Structure of the Sertoli Cell." Pp. 19–40 in *Sertoli Cell Biology*, edited by M. D. Griswold and M. K. Skinner. Elsevier Academic Press.
- Hess, Rex A., and Luiz Renato de Franca. 2008. "Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium." Pp. 1–15 in *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Vol. 636, edited by C. Y. Cheng.
- Heuschkel, Marina Augusto. 2015. "ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA NO BRASIL." Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Hirsch, Alec J., Jessica L. Smith, Nicole N. Haese, Rebecca M. Broeckel, Christopher J. Parkins, Craig Kreklywich, Victor R. DeFilippis, Michael Denton, Patricia P. Smith, William B. Messer, Lois M. A. Colgin, Rebecca M. Ducore, Peta L. Grigsby, Jon D. Hennebold, Tonya Swanson, Alfred W. Legasse, Michael K. Axthelm, Rhonda MacAllister, Clayton A. Wiley, Jay A. Nelson, and Daniel N. Streblow. 2017. "Zika Virus Infection of Rhesus

Macaques Leads to Viral Persistence in Multiple Tissues” edited by T. Geisbert. *PLOS Pathogens* 13(3):e1006219. doi: 10.1371/journal.ppat.1006219.

Hoën, Bruno, Bruno Schaub, Anna L. Funk, Vanessa Ardillon, Manon Boullard, André Cabié, Caroline Callier, Gabriel Carles, Sylvie Cassadou, Raymond Césaire, Maylis Douine, Cécile Herrmann-Storck, Philippe Kadhel, Cédric Laouénan, Yoann Madec, Alice Monthieux, Mathieu Nacher, Fatiha Najioullah, Dominique Rousset, Catherine Ryan, Kinda Schepers, Sofia Stegmann-Planchard, Benoît Tressières, Jean Luc Voluménie, Samson Yassinguez, Eustase Janky, and Arnaud Fontanet. 2018. “Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas.” *New England Journal of Medicine* 378(11):985–94. doi: 10.1056/NEJMoa1709481.

Huits, Ralph MHG, Birgit De Smet, Kevin K. Ariën, Marjan Van Esbroeck, Bouke C. de Jong, Emmanuel Bottieau, and Lieselotte Cnops. 2016. “Kinetics of Zika Virus Persistence in Semen.” *Bull World Health Organ* (July). doi: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.16.181370>.

Huits, Ralph, Birgit De Smet, Kevin K. Ariën, Marjan Van Esbroeck, Emmanuel Bottieau, and Lieselotte Cnops. 2017. “Zika Virus in Semen: A Prospective Cohort Study of Symptomatic Travellers Returning to Belgium.” *Bulletin of the World Health Organization* 95(12):802–9. doi: 10.2471/BLT.17.181370.

Jensen, Tina Kold, Rune Jacobsen, Kaare Christensen, Niels Christian Nielsen, and Erik Bostofte. 2009. “Good Semen Quality and Life Expectancy: A Cohort Study of 43,277 Men.” *Am J Epidemiol* 170(5):559–65. doi: 10.1093/aje/kwp168.

Joguet, Guillaume, Jean Michel Mansuy, Giulia Matusali, Safouane Hamdi, Marie Walschaerts, Lynda Pavili, Stefanie Guyomard, Nadia Prisant, Pierre Lamarre, Nathalie Dejuq-Rainsford, Christophe Pasquier, and Louis Bujan. 2017. “Effect of Acute Zika Virus Infection on Sperm and Virus Clearance in Body Fluids: A Prospective Observational Study.” *The Lancet Infectious Diseases* 17(11):1200–1208. doi: 10.1016/S1473-

3099(17)30444-9.

- De Jonge, Christopher. 2005. "Biological Basis for Human Capacitation." *Human Reproduction Update* 11(3):205–14. doi: 10.1093/humupd/dmi010.
- Joseph, Avenel, Barry D. Shur, Chemyong Ko, Pierre Chambon, and Rex A. Hess. 2010. "Epididymal Hypo-Osmolality Induces Abnormal Sperm Morphology and Function in the Estrogen Receptor Alpha Knockout Mouse." *Biology of Reproduction* 82(5):958–67. doi: 10.1095/biolreprod.109.080366.
- Kumar, Anil, Juan Jovel, Joaquin Lopez-Orozco, Daniel Limonta, Adriana M. Airo, Shangmei Hou, Iryna Stryapunina, Chad Fibke, Ronald B. Moore, and Tom C. Hobman. 2018. "Human Sertoli Cells Support High Levels of Zika Virus Replication and Persistence." *Scientific Reports* 8(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-018-23899-x.
- Kurscheidt, Fábio A., Cristiane S. S. Mesquita, Gabrielle M. Z. F. Damke, Edilson Damke, Analine R. B. d. A. Carvalho, Tamy T. Suehiro, Jorge J. V. Teixeira, Vânia R. S. da Silva, Raquel P. Souza, and Marcia E. L. Consolaro. 2019. "Persistence and Clinical Relevance of Zika Virus in the Male Genital Tract." *Nature Reviews Urology* 16(4):211–30. doi: 10.1038/s41585-019-0149-7.
- Lazear, Helen M., Michael S. Diamond, Chapel Hill, Immunotherapy Programs, St Louis, Helen M. Lazear, Chapel Hill, and Michael S. Diamond. 2016. "Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere." (March). doi: 10.1128/JVI.00252-16.
- Leeson, Thomas S., and Frank B. Cookson. 1974. "The Mammalian Testicular Capsule and Its Muscle Elements." *Journal of Morphology* 144(2):237–53. doi: 10.1002/jmor.1051440208.
- Lilja, H., P. A. Abrahamsson, and A. Lundwall. 1989. "Semenogelin, the Predominant Protein in Human Semen. Primary Structure and Identification of Closely Related Proteins in the Male Accessory Sex Glands and on the Spermatozoa." *Journal of Biological Chemistry* 264(3):1894–1900. doi: 10.1016/S0021-9258(18)94272-9.

- Ma, Wenqiang, Shihua Li, Shuoqian Ma, Lina Jia, Fuchun Zhang, Yong Zhang, Jingyuan Zhang, Gary Wong, Shanshan Zhang, Xuancheng Lu, Mei Liu, Jinghua Yan, Wei Li, Chengfeng Chuan Qin, Daishu Han, Chengfeng Chuan Qin, Na Wang, Xiangdong Li, and George Fu Gao. 2016. "Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice." *Cell* 167(6):1511-1524.e10. doi: 10.1038/nm.4206.
- Ma, Wenqiang, Shihua Li, Shuoqian Ma, Lina Jia, Fuchun Zhang, Yong Zhang, Jingyuan Zhang, Gary Wong, Shanshan Zhang, Xuancheng Lu, Mei Liu, Jinghua Yan, Wei Li, Chuan Qin, Daishu Han, Chengfeng Qin, Na Wang, Xiangdong Li, and George Fu Gao. 2016. "Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice." *Cell* 167:1511–24. doi: 10.1038/nm.4206.
- Mansuy, Jean Michel, Elsa Suberbielle, Sabine Chapuy-Regaud, Catherine Mengelle, Louis Bujan, Bruno Marchou, Pierre Delobel, Daniel Gonzalez-Dunia, Cécile E. Malnou, Jacques Izopet, and Guillaume Martin-Blondel. 2016. "Zika Virus in Semen and Spermatozoa." *The Lancet Infectious Diseases* 16(10):1106–7. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30336-X.
- Marchette, N. J., R. Garcia, and A. Rudnick. 1969. "Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18(3):411–15. doi: 10.4269/ajtmh.1969.18.411.
- Matusali, Giulia, Laurent Houzet, Anne Pascale Satie, Dominique Mahé, Florence Aubry, Thérèse Couderc, Julie Frouard, Salomé Bourgeau, Karim Bensalah, Sylvain Lavoué, Guillaume Joguet, Louis Bujan, André Cabié, Gleide Avelar, Marc Lecuit, Anna Le Tortorec, and Nathalie Dejucq-Rainsford. 2018. "Zika Virus Infects Human Testicular Tissue and Germ Cells." *Journal of Clinical Investigation* 128(10):4697–4710. doi: 10.1172/JCI121735.
- McCabe, Mark, Caroline Foo, Marcel Dinger, Peter Smooker, and Peter Stanton. 2016. "Claudin-11 and Occludin Are Major Contributors to Sertoli Cell Tight Junction Function, in Vitro." *Asian Journal of Andrology* 18(4):620–26. doi: 10.4103/1008-682X.163189.

- McCarthy, Michael. 2016. "Zika Virus Was Transmitted by Sexual Contact in Texas, Health Officials Report." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 352(February):i720. doi: 10.1136/bmj.i720.
- Mcintyre, Barry S., Norman J. Barlow, and Paul M. D. Foster. 2001. "Androgen-Mediated Development in Male Rat Offspring Exposed to Flutamide in Utero: Permanence and Correlation of Early Postnatal Changes in Anogenital Distance and Nipple Retention with Malformations in Androgen-Dependent Tissues." *Toxicol Sci.* 62(2):236–49. doi: 10.1093/toxsci/62.2.236.
- Mead, Paul S., Nisha K. Duggal, Sarah A. Hook, Mark Delorey, Marc Fischer, Dana Olzenak McGuire, Heidi Becksted, Ryan J. Max, Michael Anishchenko, Amy M. Schwartz, Wen-Pin Tzeng, Christina A. Nelson, Erin M. McDonald, John T. Brooks, Aaron C. Brault, and Alison F. Hinckley. 2018. "Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men." *New England Journal of Medicine* 378(15):1377–85. doi: 10.1056/NEJMoa1711038.
- Miller, Walter L., and Zoran S. Gucev. 2014. "Disorders in the Initial Steps in Steroidogenesis." Pp. 145–64 in *Genetic Steroid Disorders*, edited by M. I. New, O. Lekarev, A. Parsa, T. T. Yuen, B. W. O'Malley, and G. D. Hammer.
- Miner, Jonathan J., Bin Cao, Jennifer Govero, Amber M. Smith, Estefania Fernandez, Omar H. Cabrera, Charise Garber, Michelle Noll, Robyn S. Klein, Kevin K. Noguchi, Indira U. Mysorekar, and Michael S. Diamond. 2016. "Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise." *Cell* 165(5):1081–91. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.008.
- Mlakar, Jernej, Misa Korva, Nataša Tul, Mara Popović, Mateja Poljšak-Prijatelj, Jerica Mraz, Marko Kolenc, Katarina Resman Rus, Tina Vesnaver Vipotnik, Vesna Fabjan Vodusek, Alenka Vizjak, Jože Pižem, Miroslav Petrovec, and Tatjana Avšič Zupanc. 2016. "Zika Virus Associated with Microcephaly." *New England Journal of Medicine* 374(10):951–58. doi:

10.1056/NEJMoa1600651.

Musso, D., T. Nhan, E. Robin, C. Roche, D. Bierlaire, K. Zisou, A. Shan Yan, V. M. Cao-Lormeau, and J. Broutl. 2014. "Potential for Zika Virus Transmission through Blood Transfusion Demonstrated during an Outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014." *Eurosurveillance* 19(14):14–16. doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761.

Musso, Didier, and Duane J. Gubler. 2016. "Zika Virus." *WPRO Fact Sheets* 29(3):1-. doi: 10.1128/CMR.00072-15.Address.

Musso, Didier, Albert I. Ko, and David Baud. 2019. "Zika Virus Infection-After the Pandemic." *The New England Journal of Medicine* 381:1444–57. doi: 10.1056/NEJMra1808246.

Musso, Didier, Claudine Roche, Emilie Robin, Tuxuan Nhan, Anita Teissier, and Van Mai Cao-Lormeau. 2015. "Potential Sexual Transmission of Zika Virus." *Emerging Infectious Diseases* 21(2):359–61. doi: 10.3201/eid2102.141363.

Musso, Didier, Eline Rouault, Anita Teissier, Marion C. Lanteri, Karen Zisou, Julien Broutl, Emilie Grange, Tu Xuan Nhan, and Maite Aubry. 2017. "Molecular Detection of Zika Virus in Blood and RNA Load Determination during the French Polynesian Outbreak." *Journal of Medical Virology* 89(9):1505–10. doi: 10.1002/jmv.24735.

Nica B Frungieri, M^o, Ricardo S. Calandra, Artur Mayerhofer, and Mar^{ía} E. Matzkin. 2015. "Cyclooxygenase and Prostaglandins in Somatic Cell Populations of the Testis." *Reproduction* 149(4):R169–80. doi: 10.1530/REP-14-0392.

Nicastri, E., Concetta Castilletti, G. Liuzzi, M. Iannetta, M. R. Capobianchi, and G. Ippolito. 2016. "Persistent Detection of Zika Virus RNA in Semen for Six Months after Symptom Onset in a Traveller Returning from Haiti to Italy, February 2016." *Eurosurveillance* 21(32):1–4. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.32.30314.

O'bryan, Moira K., Stefan Schlatt, Orapin Gerdprasert, David J. Phillips, David

M. De Kretser, and Mark P. Hedger. 2000. "Inducible Nitric Oxide Synthase in the Rat Testis: Evidence for Potential Roles in Both Normal Function and Inflammation-Mediated Infertility 1." *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 63(5):1285–93. doi: 10.1095/biolreprod63.5.1285.

Oduyebo, Titilope, Kara D. Polen, Henry T. Walke, Sarah Reagan-Steiner, Eva Lathrop, Ingrid B. Rabe, Wendi L. Kuhnert-Tallman, Stacey W. Martin, Allison T. Walker, Christopher J. Gregory, Edwin W. Ades, Darin S. Carroll, Maria Rivera, Janice Perez-Padilla, Carolyn Gould, Jeffrey B. Nemhauser, C. Ben Beard, Jennifer L. Harcourt, Laura Viens, Michael Johansson, Sascha R. Ellington, Emily Petersen, Laura A. Smith, Jessica Reichard, Jorge Munoz-Jordan, Michael J. Beach, Dale A. Rose, Ezra Barzilay, Michelle Noonan-Smith, Denise J. Jamieson, Sherif R. Zaki, Lyle R. Petersen, Margaret A. Honein, and Dana Meaney-Delman. 2017. "Update: Interim Guidance for Health Care Providers Caring for Pregnant Women with Possible Zika Virus Exposure — United States (Including U.S. Territories), July 2017." *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 66(29):781–93. doi: 10.15585/mmwr.mm6629e1.

Oliva, Rafael. 2006. "Protamines and Male Infertility." *Human Reproduction Update* 12(4):417–35. doi: 10.1093/humupd/dml009.

Oliveira, Diogo N. de, Estela O. Lima, Carlos F. O. R. Melo, Jeany Delafiori, Tatiane M. Guerreiro, Rafael G. M. Rodrigues, Karen N. Morishita, Cynthia Silveira, Stéfanie Primon Muraro, Gabriela Fabiano De Souza, Aline Vieira, Antônio Silva, Rosângela F. Batista, Maria J. R. Doriqi, Patricia S. Sousa, Guilherme P. Milanez, José L. Proença-Módena, Denise P. Cavalcanti, and Rodrigo R. Catharino. 2019. "Inflammation Markers in the Saliva of Infants Born from Zika-Infected Mothers: Exploring Potential Mechanisms of Microcephaly during Fetal Development." *Scientific Reports* 9(1):1–7. doi: 10.1038/s41598-019-49796-5.

Oliveira, Salmo Azambuja de, Paulo Sérgio Cerri, and Estela Sasso-Cerri. 2021. "Impaired Macrophages and Failure of Steroidogenesis and Spermatogenesis in Rat Testes with Cytokines Deficiency Induced by Diacerein." *Histochemistry and Cell Biology* 156(6):561–81. doi:

10.1007/s00418-021-02023-7.

- Oster, Alexandra M., John T. Brooks, Jo Ellen Stryker, Rachel E. Kachur, Paul Mead, Nicki T. Pesik, and Lyle R. Petersen. 2016. "Interim Guidelines for Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus — United States, 2016." *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report - CDC* 65(29):745–47. doi: 10.15585/mmwr.mm6529e2.
- Palermo, G., H. Joris, P. Devroey, and A. C. Van Steirteghem. 1992. "Pregnancies after Intracytoplasmic Injection of Single Spermatozoon into an Oocyte." *The Lancet* 340(8810):17–18. doi: 10.1016/0140-6736(92)92425-F.
- Pan American Health Organisation. 2015. "Epidemiological Alert. Neurological Syndrome, Congenital Malformations, and Zika Virus Infection. Implications for Public Health in the Americas." *Pan American Health Organization*, 1–11.
- Pasqualotto, F. F., R. K. Sharma, H. Kobayashi, D. R. Nelson, A. J. Thomas, and A. Agarwal. 2001. "Oxidative Stress in Normospermic Men Undergoing Infertility Evaluation." *Journal of Andrology* 22(2):316–22.
- Payne, Anita H., and Dale B. Hales. 2004. "Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones." *Endocrine Reviews* 25(6):947–70. doi: 10.1210/er.2003-0030.
- Pelegrina, R. Fernández, A. G. Kessler, and R. G. Rawlins. 1991. "Modern Approaches to the Treatment of Human Infertility through Assisted Reproduction." *Puerto Rico Health Sciences Journal* 10(2):75–81.
- Peruzzato, Fernanda Souza, Alecsandra do Prado Gomes, Débora Rodrigues Lopes, and Hamilton De Martim. 2017. "Espermograma." Pp. 110–19 in *Reprodução Assistida \ Técnicas de Laboratório *, edited by R. Azambuja, A. C. Mancebo, C. Petersen, F. Mizrahi, J. R. Alegretti, M. T. Sanseverino, P. Diniz, R. Alvarenga, and S. Nacheff.
- Petersen, Cecilia, and Olle Söder. 2006. "The Sertoli Cell - A Hormonal Target and 'super' Nurse for Germ Cells That Determines Testicular Size."

Hormone Research 66(4):153–61. doi: 10.1159/000094142.

Petersen, Emily E., Dana Meaney-Delman, Robyn Neblett-Fanfair, Fiona Havers, Titilope Oduyebo, Susan L. Hills, Ingrid B. Rabe, Amy Lambert, Julia Abercrombie, Stacey W. Martin, Carolyn V. Gould, Nadia Oussayef, Kara N. D. Polen, Matthew J. Kuehnert, Satish K. Pillai, Lyle R. Petersen, Margaret A. Honein, Denise J. Jamieson, and John T. Brooks. 2016. “Update: Interim Guidance for Preconception Counseling and Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus for Persons with Possible Zika Virus Exposure — United States, September 2016.” *Morbidity and Mortality Weekly Report - MMWR* 65(39):1077–81. doi: 10.15585/mmwr.mm6539e1.

Petersen, Emily E., Kara N. D. Polen, Dana Meaney-Delman, Sascha R. Ellington, Titilope Oduyebo, Amanda Cohn, Alexandra M. Oster, Kate Russell, Jennifer F. Kawwass, Mateusz P. Karwowski, Ann M. Powers, Jeanne Bertolli, John T. Brooks, Dmitry Kissin, Julie Villanueva, Jorge Muñoz-Jordan, Matthew Kuehnert, Christine K. Olson, Margaret A. Honein, Maria Rivera, Denise J. Jamieson, and Sonja A. Rasmussen. 2016. “Update: Interim Guidance for Health Care Providers Caring for Women of Reproductive Age with Possible Zika Virus Exposure — United States, 2016.” *Morbidity and Mortality Weekly Report - MMWR*. 65(12). doi: 10.15585/mmwr.mm6512e2er.

Du Plessis, Stefan Stephanus, Sheila Gokul, and Ashok Agarwal. 2013. *Semen Hyperviscosity: Causes, Consequences, and Cures*. Vol. 5.

Pourmasumi, Soheila, Arezoo Khoradmehr, Tahereh Rahiminia, Parvin Sabeti, Ali Reza Talebi, and Jalal Ghasemzadeh. 2019. “Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men.” *Journal of Reproduction & Infertility* 20(2):95–101.

Prisant, Nadia, Guillaume Joguet, Catherine Moriniere, Lynda Pavili, Sylvia Lurel, Cecile Herrmann-Stock, and Louis Bujan. 2019. “Upper and Lower Genital Tract Zika Virus Screening in a Large Cohort of Reproductive-Age Women during the Americas Epidemic.” *Reproductive BioMedicine Online*

39(4):624–32. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.05.013.

Rabe, Ingrid B., J. Erin Staples, Julie Villanueva, Kimberly B. Hummel, Jeffrey A. Johnson, Laura Rose, Susan Hills, Annemarie Wasley, Marc Fischer, and Ann M. Powers. 2016. “Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results.” *Morbidity and Mortality Weekly Report - MMWR* 65(21):543–46. doi: 10.15585/mmwr.mm6521e1.

Robaire, B., and R. S. Viger. 1995. “Regulation of Epididymal Epithelial Cell Functions.” *Biology of Reproduction* 52(2):226–36. doi: 10.1095/biolreprod52.2.226.

Robinson, Christopher L., Angie C. N. Chong, Alison W. Ashbrook, Ginnie Jeng, Julia Jin, Haiqi Chen, Elizabeth I. Tang, Laura A. Martin, Rosa S. Kim, Reyn M. Kenyon, Eileen Do, Joseph M. Luna, Mohsan Saeed, Lori Zeltser, Harold Ralph, Vanessa L. Dudley, Marc Goldstein, Charles M. Rice, C. Yan Cheng, Marco Seandel, and Shuibing Chen. 2018. “Male Germ Cells Support Long-Term Propagation of Zika Virus.” *Nature Communications* 9(1):1–11. doi: 10.1038/s41467-018-04444-w.

Russell, Lonnie D., Robert A. Ettl, Amiya P. Sinha Hikim, and Eric D. Clegg. 1990. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 1st ed. Clearwater: Cache River Press.

Russell, Lonnie D., and Luiz Renato de França. 1995. “Building a Testis.” *Tissue and Cell* 27(2):129–47. doi: 10.1016/S0040-8166(95)80016-6.

Saleh, Ramadan A., Ashok Agarwal, Engin Kandirali, Rakesh K. Sharma, Anthony J. Thomas, Essam A. Nada, Donald P. Evenson, and Juan G. Alvarez. 2002. “Leukocytospermia Is Associated with Increased Reactive Oxygen Species Production by Human Spermatozoa.” *Fertility and Sterility* 78(6):1215–24. doi: 10.1016/S0015-0282(02)04237-1.

Saling, P. M., and B. T. Storey. 1979. “Mouse Gamete Interactions during Fertilization in Vitro. Chlortetracycline as a Fluorescent Probe for the Mouse Sperm Acrosome Reaction.” *Journal of Cell Biology* 83(3):544–55. doi: 10.1083/jcb.83.3.544.

- Sepaniak, Sandrine, Thierry Forges, Hubert Gerard, Bernard Foliguet, Marie Christine Bene, and Patricia Monnier-Barbarino. 2006. "The Influence of Cigarette Smoking on Human Sperm Quality and DNA Fragmentation." *Toxicology* 223(1–2):54–60. doi: 10.1016/j.tox.2006.03.001.
- Setchell, B. P., and W. G. Breed. 2006. "Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract." Pp. 771–825 in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Vol. Third Edit.
- Shaha, Chandrima. 2008. "Estrogens and Spermatogenesis." *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* 636:42–64. doi: 10.1007/978-0-387-09597-4_3.
- Sheng, Zi Yang, Na Gao, Zhao Yang Wang, Xiao Yun Cui, De Shan Zhou, Dong Ying Fan, Hui Chen, Pei Gang Wang, and Jing An. 2017. "Sertoli Cells Are Susceptible to ZIKV Infection in Mouse Testis." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7(JUN):1–13. doi: 10.3389/fcimb.2017.00272.
- Simon, Luke, Benjamin Emery, and Douglas T. Carrell. 2019. "Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1166:87–105. doi: 10.1007/978-3-030-21664-1_6.
- Simon, Luke, Deborah Lutton, Joanne McManus, and Sheena E. M. Lewis. 2011. "Sperm DNA Damage Measured by the Alkaline Comet Assay as an Independent Predictor of Male Infertility and in Vitro Fertilization Success." *Fertility and Sterility* 95(2):652–57. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.08.019.
- Smit, Marij, Johannes C. Romijn, Mark F. Wildhagen, Robertus F. A. Weber, and Gert R. Dohle. 2010. "Sperm Chromatin Structure Is Associated with the Quality of Spermatogenesis in Infertile Patients." *Fertility and Sterility* 94(5):1748–52. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.030.
- Smith, L. B., L. Milne, N. Nelson, Eddie S. Brown, Pamela Brown, Nina Atanassova, Moira K. O'Bryan, Liza O'Donnell, Danielle Rhodes, Sara Wells, Diane Napper, Patrick Nolan, Zuzanna Lalanne, Michael Cheeseman, and Josephine Peters. 2012. "KATNAL1 Regulation of Sertoli

Cell Microtubule Dynamics Is Essential for Spermiogenesis and Male Fertility." *PLoS Genet* 8(5):1002697. doi: 10.1371/journal.pgen.1002697.

Smith, Lee B., and William H. Walker. 2014. "The Regulation of Spermatogenesis by Androgens." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 30:2–13. doi: 10.1016/j.semcd.2014.02.012.

Song, Byung Hak, Sang Im Yun, Michael Woolley, and Young Min Lee. 2017. "Zika Virus: History, Epidemiology, Transmission, and Clinical Presentation." *Journal of Neuroimmunology* 308:50–64. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.03.001.

Stanelle-Bertram, Stephanie, Kerstin Walendy-Gnirß, Thomas Speiseder, Swantje Thiele, Ivy Asantewaa Asante, Carola Dreier, Nancy Mounogou Kouassi, Annette Preuß, Gundula Pilnitz-Stolze, Ursula Müller, Stefanie Thanisch, Melanie Richter, Robin Scharrenberg, Vanessa Kraus, Ronja Dörk, Lynn Schau, Vanessa Herder, Ingo Gerhauser, Vanessa Maria Pfankuche, Christopher Käufer, Inken Waltl, Thais Moraes, Julie Sellau, Stefan Hoenow, Jonas Schmidt-Chanasit, Stephanie Jansen, Benjamin Schattling, Harald Ittrich, Udo Bartsch, Thomas Renné, Ralf Bartenschlager, Petra Arck, Daniel Cadar, Manuel A. Friese, Olli Vapalahti, Hanna Lotter, Sany Benites, Lane Rolling, Martin Gabriel, Wolfgang Baumgärtner, Fabio Morellini, Sabine M. Hölter, Oana Amarie, Helmut Fuchs, Martin Hrabe de Angelis, Wolfgang Löscher, Froylan Calderon de Anda, and Gülsah Gabriel. 2018. "Male Offspring Born to Mildly ZIKV-Infected Mice Are at Risk of Developing Neurocognitive Disorders in Adulthood." *Nature Microbiology* 3(10):1161–74. doi: 10.1038/s41564-018-0236-1.

Sullivan, Robert, Gilles Frenette, and Julie Girouard. 2007. "Epididymosomes Are Involved in the Acquisition of New Sperm Proteins during Epididymal Transit." *Asian Journal of Andrology* 9(4):483–91. doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00281.x.

The Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada - SOGC. n.d. "Assisted Reproduction."

- Le Tortorec, Anna, Giulia Matusali, Dominique Mahé, Florence Aubry, Séverine Mazaud-Guittot, Laurent Houzet, and Nathalie Dejuçq-Rainsford. 2020. "From Ancient to Emerging Infections: The Odyssey of Viruses in the Male Genital Tract." *Physiological Reviews* 100(3):1349–1414. doi: 10.1152/physrev.00021.2019.
- Tsetsarkin, Konstantin A., Olga A. Maximova, Guangping Liu, Heather Kenney, Natalia Teterina, Marshall E. Bloom, Jeffrey M. Grabowski, Luwanika Mlera, Bianca M. Nagata, Ian Moore, Craig Martens, Emerito Amaro-Carambot, Elaine W. Lamirande, Stephen S. Whitehead, and Alexander G. Pletnev. 2018. "Routes of Zika Virus Dissemination in the Testis and Epididymis of Immunodeficient Mice." *Nature Communications* 9(1):1–13. doi: 10.1038/s41467-018-07782-x.
- Uraki, Ryuta, Jesse Hwang, Kellie Ann Jurado, Sarah Householder, Laura J. Yockey, Andrew K. Hastings, Robert J. Homer, Akiko Iwasaki, and Erol Fikrig. 2017. "Zika Virus Causes Testicular Atrophy." *Science Advances* 3(2):1–6. doi: 10.1126/sciadv.1602899.
- De Vasconcelos, Romulo A. L., Ricardo A. A. Ximenes, Adriano A. Calado, Celina M. T. Martelli, Andreia V. Gonçalves, Elizabeth B. Brickley, Thalia V. B. De Araujo, Maria Angela Wanderley Rocha, and Democrito De B. Miranda-Filho. 2020. "Cryptorchidism in Children with Zika-Related Microcephaly." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 102(5):982–84. doi: 10.4269/AJTMH.19-0753.
- Verza Jr., Sidney, Letícia Schimidt Arruda, Ana Paula de Sousa Kussler, and Sandro C. Esteves. 2017. "Fragmentação Do DNA Espermático." Pp. 120–33 in *Reprodução Assistida \ Técnicas de Laboratório *, edited by R. Azambuja, A. C. Mancebo, C. Petersen, F. Mizrahi, J. R. Alegretti, M. T. Sanseverino, P. Diniz, R. Alvarenga, and S. Nacheff.
- Vicari, Enzo, Anna Perdichizzi, Adele De Palma, Nunziatina Burrello, Rosario D'Agata, and Aldo E. Calogero. 2002. "Globozoospermia Is Associated with Chromatin Structure Abnormalities: Case Report." *Human Reproduction (Oxford, England)* 17(8):2128–33. doi: 10.1093/HUMREP/17.8.2128.

- Vieira, Carolina Pinhol. 2019. "Efeitos Morfoestruturais Da Exposição Pré-Natal a Glicocorticoide No Testículo e Avaliação Dos Parâmetros Espermáticos de Camundongos." Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
- Visconti, P. E., Hannah Galantino-Homer, Grace D. Moore, Janice L. Bailey, Xiaoping Ning, Miguel Fornes, and Gregory S. Kopf. 1998. "The Molecular Basis of Sperm Capacitation." *Zygote -Cambridge-* 19(2):242–48.
- Vujkovic, M., J. H. De Vries, G. R. Dohle, G. J. Bonsel, J. Lindemans, N. S. Macklon, P. J. Van Der Spek, E. A. P. Steegers, and R. P. M. Steegers-Theunissen. 2009. "Associations between Dietary Patterns and Semen Quality in Men Undergoing IVF/ICSI Treatment." *Human Reproduction* 24(6):1304–12. doi: 10.1093/humrep/dep024.
- Wang, Qi, Yun Xie, Qian He, Yan Geng, and Jiru Xu. 2021. "LncRNA-Cox2 Regulates Macrophage Polarization and Inflammatory Response through the CREB-C/EBP β Signaling Pathway in Septic Mice." *International Immunopharmacology* 101(Pt B). doi: 10.1016/J.INTIMP.2021.108347.
- Wang, Yiluan, Yuanyuan Shan, Yiyang Wang, Yinghui Fang, Tongliang Huang, Songxue Wang, Qiqi Zhu, Xiaoheng Li, and Ren Shan Ge. 2019. "Aconitine Inhibits Androgen Synthesis Enzymes by Rat Immature Leydig Cells via Down-Regulating Androgen Synthetic Enzyme Expression in Vitro." *Chemico-Biological Interactions* 312. doi: 10.1016/j.cbi.2019.108817.
- Waris, Gulam, and Aleem Siddiqui. 2005. "Hepatitis C Virus Stimulates the Expression of Cyclooxygenase-2 via Oxidative Stress: Role of Prostaglandin E2 in RNA Replication." *Journal of Virology* 79(15):9725–34. doi: 10.1128/JVI.79.15.9725.
- Wassarman, Paul M. 1987. "Early Events in Mammalian Fertilization." *Cell Biology* 109–42. doi: 10.1146/annurev.cb.03.110187.000545.
- Weider, Karola, Martin Bergmann, and Ralph Brehm. 2011. "Connexin 43: Its Regulatory Role in Testicular Junction Dynamics and Spermatogenesis." *Histology and Histopathology* 26(10):1343–52. doi: 10.14670/HH-26.1343.
- WHO. 2010. "WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of

Human Semen.” *World Health Organization* Edition, V(10):286. doi: 10.1038/aja.2008.57.

WHO. 2021. *6 Th Edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen | Draft for Public Review |*. World Health Organization.

Winkler, Clayton W., Lara M. Myers, Tyson A. Woods, Ronald J. Messer, Aaron B. Carmody, Kristin L. McNally, Dana P. Scott, Kim J. Hasenkrug, Sonja M. Best, and Karin E. Peterson. 2017. “Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes.” *The Journal of Immunology* 198(9):3526–35. doi: 10.4049/jimmunol.1601949.

Wu, Han, Lili Shi, Qing Wang, Lijing Cheng, Xiang Zhao, Qiaoyuan Chen, Qian Jiang, Min Feng, Qihan Li, and Daishu Han. 2016. “Mumps Virus-Induced Innate Immune Responses in Mouse Sertoli and Leydig Cells.” *Scientific Reports* 6:1–15. doi: 10.1038/srep19507.

Yan Cheng, C., and Dolores D. Mruk. 2012. “The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception.” *Pharmacological Reviews* 64(1):16–64. doi: 10.1124/pr.110.002790.

Yang, Wei, Yan Hua Wu, Shuang Qing Liu, Zi Yang Sheng, Zi Da Zhen, Rui Qi Gao, Xiao Yun Cui, Dong Ying Fan, Zhi Hai Qin, Ai Hua Zheng, Pei Gang Wang, and Jing An. 2020. “S100A4+ Macrophages Facilitate Zika Virus Invasion and Persistence in the Seminiferous Tubules via Interferon-Gamma Mediation.” *PLoS Pathogens* 16(12 December):e1009019. doi: 10.1371/journal.ppat.1009019.

Yarrington, Christina D., Davidson H. Hamer, Wendy Kuohung, and Aviva Lee-Parritz. 2019. “Congenital Zika Syndrome Arising from Sexual Transmission of Zika Virus, a Case Report.” *Fertility Research and Practice* 5(1):1–4. doi: 10.1186/s40738-018-0053-5.

Zanluca, Camila, Vanessa Campos Andrade De Melo, Ana Luiza Pamplona Mosimann, Glauco Igor Viana Dos Santos, Claudia Nunes Duarte dos Santos, and Kleber Luz. 2015. “First Report of Autochthonous

Transmission of Zika Virus in Brazil.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 110(4):569–72. doi: 10.1590/0074-02760150192.

Zegers-Hochschild, F., G. D. Adamson, J. De Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan, and S. Vanderpoel. 2009. “International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary of ART Terminology, 2009∗” *Research Training in Human Reproduction, World Health Organization* 95(5):1520–24. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.009.

Zirkin, Barry R. 2005. “Cyclooxygenase-2 and Reduced Steroidogenesis in the Aging Male.” *Endocrinology* 146(10):4200–4201. doi: 10.1210/en.2005-0977.