



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

ANDERSON ARNALDO DA SILVA

A INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA CAUSA ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS
TESTICULARES E ESPERMÁTICAS EM CAMUNDONGOS BALB/C ADULTOS

Recife

2020

ANDERSON ARNALDO DA SILVA

A INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA CAUSA ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS
TESTICULARES E ESPERMÁTICAS EM CAMUNDONGOS BALB/C ADULTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Orientador: Dr. Luiz Carlos Alves

Coorientador: Dr^a Fernanda Carolina Ribeiro Dias

Recife

2020

Catálogo na fonte:

Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Anderson Arnaldo da Silva

A infecção pelo vírus Zika causa alterações morfológicas testiculares e espermáticas em camundongos balb/C adultos / Anderson Arnaldo da Silva - 2020.

73 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Carlos Alves

Coorientadora: Fernanda Carolina Ribeiro Dias

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2020.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Zika 2. Espermatogênese 3. Reprodução

I. Alves, Luiz Carlos (Orientador) II. Dias, Fernanda Carolina Ribeiro (Coorientadora) III. Título

616.07 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-119

ANDERSON ARNALDO DA SILVA

A INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA CAUSA ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS
TESTICULARES E ESPERMÁTICAS EM CAMUNDONGOS BALB/C ADULTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 17/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves (Orientador)
Instituto Aggeu Magalhães – IAM/FIOCRUZ

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior (Examinador Externo)
Universidade Federal de Viçosa

Prof. Lindomar José Pena (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães – IAM/FIOCRUZ

Dedico

Aos meus ancestrais e à minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus ancestrais. Homens e mulheres fortes, destituídos de suas casas, escravizados e forçados a edificar parte do novo mundo. Durante muitos anos buscaram sobreviver e lutaram por igualdade de direitos, inclusive o de possuir acesso à educação. Hoje defendo esta dissertação de mestrado, não apenas por mim, mas também por eles. Sou o fruto do esforço e de sacrifícios de várias e várias gerações. Muito obrigado por me permitirem protagonizar este momento. Sou muito grato a todos vocês. Axé!

Aos meus pais, Arnaldo Silva e Lidiane Alves, e à minha avó, Luciene Alves, por todo amor, apoio e ensinamentos ao longo de toda minha vida. Graças a vocês cheguei até aqui. Meu eterno e infindável sentimento de gratidão.

Aos meus queridos amigos, Rodrigo Cardoso, Thiago Aguiar, Henrique Bispo e tantos outros, por todo o apoio, companheirismo e amizade ao longo de todos esses anos, muito obrigado.

À Nairomberg Portela, Amanda Vasconcelos, Ayug Lemos, Fernanda Lima e Daivyane Mota, amigos que a academia me presenteou de forma tão linda. Obrigado por todos os momentos e por tornarem o meu dia-a-dia mais leve e feliz.

À Tainá Santos e Thaynara Oliveira, pela grande e eterna amizade desde o início da graduação e por toda a ajuda na realização deste trabalho. Se consegui obter forças para seguir com tudo isso, sem dúvidas, foi também graças a vocês. Sou eternamente grato a nossa amizade e companheirismo.

Aos meus grandes amigos, mentores e também orientadores Fernanda Ribeiro Dias e Olávio Campos Jr. Sempre me inspiraram a me tornar um homem melhor, mais humano e um profissional competente. Nenhuma palavra seria capaz de representar toda minha admiração e gratidão a vocês. Agradeço por todo o companheirismo, compromisso e amor em todos esses anos e também pelo apoio na execução deste trabalho.

À toda a equipe do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM/FIOCRUZ-PE) por todo apoio e assistência durante a realização deste projeto.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco por todo o companheirismo e amizade. Agradeço, em especial, à Prof^a Elizabeth

Neves, antes orientadora e hoje grande amiga. Obrigado por todos os conselhos e apoio emocional durante todos estes anos.

Aos colegas e colaboradores do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE/IAM), Bárbara Nayane, Poliana Gomes, Rafael Rosa e Klarissa Guarines, por toda disponibilidade oferecida a mim. Muito obrigado.

Ao Dr. Lindomar Pena por disponibilizar a cepa do vírus Zika.

À Karen Pena pela imensa ajuda na realização das análises imunohistoquímicas. Muito obrigado.

À Jana Sandes, Rafael Padilha e Fábio Brayner pela assistência no processamento e nas análises de Microscopia Eletrônica. Obrigado.

À Paula Silva, Amanda Vasconcelos e Karla Ribeiro pelo apoio na manutenção das células Vero. Obrigado.

À Dr^a Maria Helena, médica veterinária e responsável técnica do Biotério do LIKA/UFPE e ao Sr. Ailton pela assistência e acompanhamento dos animais durante este estudo. Muito obrigado.

À Fábio Costa, secretário do PPGBAS, por todo o suporte e ajuda durante estes dois anos de caminhada. Muito obrigado.

À Sr^a Vera Lúcia, nossa “Verinha”, que muito além de cuidar dos laboratórios, cuidava de nós. Agradeço por cada conversa, por cada abraço e por todos os momentos felizes proporcionados por ela. Sua simplicidade, alegria e seu grande coração me ensinaram muito. Gratidão por tudo.

Ao Sr. Severino, jardineiro da FIOCRUZ/PE, carinhosamente apelidado de “Biu”. Seu “Bom dia!” dado a cada manhã, carregado de simplicidade e simpatia, sempre melhoravam o meu dia logo no início. Muito obrigado por me fazer lembrar que existem pessoas boas ao nosso redor. Mesmo sem falar muito o senhor me ensinou bastante, muitas vezes apenas com o sorriso e com o olhar.

Agradeço aos animais utilizados neste estudo.

À todos aqueles que, por ventura, não foram citados, mas que de alguma forma permitiram a execução deste trabalho. Muito obrigado.

Ao Dr. Luiz Calos Alves, pela orientação acadêmica. Muito obrigado.

À banca examinadora.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pela concessão da bolsa, o que viabilizou a execução deste trabalho. Obrigado.

Graças a vocês cheguei até aqui. Meu sincero e profundo sentimento de gratidão a todos.

“A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutro
lugar o que ela não nos pode dar”

Sigmund Freud

RESUMO

O vírus Zika, arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, pode ser transmitido através de vias não vetoriais, verticalmente, entre mãe e filho e através do sexo sem o uso de preservativos. Após essa descoberta a atenção passou a ser direcionada ao sistema reprodutor masculino, como um possível sítio de disseminação do vírus. Apesar da existência de pesquisas, essas não trazem informações detalhadas sobre a organização testicular de indivíduos infectados, discutindo sua repercussão funcional sobre a fertilidade do macho. Desta forma, este trabalho buscou evidenciar as alterações em nível celular e tecidual da infecção pelo vírus Zika no testículo de camundongos adultos. Para isso, camundongos de linhagem balb/C foram imunodeprimidos com dexametasona e infectados com o vírus, sendo submetidos a eutanásia em 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias pós infecção, havendo um grupo controle para cada grupo de animais infectados (n=10/grupo). Após eutanásia, os testículos e epidídimos foram coletados e processados para a realização de análises histológicas, imunohistoquímicas, de estresse oxidativo e função espermática. Foi visto que o vírus Zika alterou parâmetros biométricos, como o peso corporal, além de ter causado alterações morfológicas na gônada e nos espermatozoides. Mudanças como alterações no volume e no número de alguns tipos celulares do compartimento intertubular foram observados, bem como alterações no volume dos túbulos seminíferos e de seus componentes e o surgimento de patologias tubulares. Alterações bioquímicas de estresse oxidativo também foram identificadas, corroborando com os resultados obtidos. Também foram observadas alterações morfofuncionais nos espermatozoides, que apresentaram defeitos em seus componentes e disfunção na rotação do flagelo, além de alteração na membrana plasmática. De modo geral, a infecção pelo vírus Zika, em animais imunodeprimidos com dexametasona, modificou a função espermática e a estrutura testicular, tendo seu agravamento iniciado no 28º dia pós infecção e declínio ao 42º dia.

PALAVRAS-CHAVE: Espermatogênese. Reprodução. Testículo. Infecção. Zika.

ABSTRACT

The Zika virus, an arbovirus from the family Flaviviridae, may be transmitted through non-vector routes, vertically, between mother and child, and through sex without using condoms. After this discovery, the attention began to be directed to the male reproductive system, as a possible location for the spread of the virus. Despite the existence of researches, these do not provide information on the testicular organization of infected individuals, discussing their functional repercussions on male fertility. Thus, this work sought to show how changes in the cellular and tissue level of Zika virus infection in the testicles of adult mice. For this, mice of the Balb / C strain were immunosuppressed with dexamethasone and infected with viruses, being euthanized at 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days after infection, with a control group for each group of infected animals. (n = 10 / group). After euthanasia, the testicles and epididymis were collected and processed for histological, immunohistochemical, oxidative stress and sperm functions analysis. It was noticed that the Zika virus alters biometric parameters, such as body weight, in addition to undergoing morphological changes in the gonad and sperm. Changes such as volume and cell types number in the intertubular compartment. As well as changes in the volume of seminiferous tunnels and their components and treatment of tubular pathologies. Biochemical changes in oxidative stress have also been identified, corroborating the results. Morphofunctional changes in sperm were also observed, which detected defects in its components and dysfunction in flagellar rotation, in addition to changes in the plasma membrane. In general, an infection by the Zika virus, in animals immunosuppressed with dexamethasone, modified a sperm function and a testicular structure, with its disease starting on the 28th day after infection and declining on the 42nd day.

KEYWORDS: Spermatogenesis. Reproduction. Testicle. Infection. Zika.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Infográfico sobre a dispersão global do ZIKV ao longo dos anos desde seu primeiro relato em 1947.....	21
Figura 2 -	Anatomia do epidídimo com a indicação aproximada das suas partes: Cabeça, corpo e cauda do epidídimo.....	27
Figura 3 -	Camundongos em microisoladores dispostos em estante ventilada (Alesco®) – Biotério LIKA/UFPE.....	31
Figura 4 -	Protocolo de imunodepressão farmacológica com dexametasona e infecção por ZIKV.....	32
Figura 5 -	Ilustração do delineamento experimental.....	33
Figura 6 -	Gráficos de dispersão para as análises de PC, PT, PAlb, PPar, IGS e IPS.....	40
Figura 7 -	Representação gráfica do Índice Tubulossomático e Epiteliossomático...	41
Figura 8 -	Porcentagem de túbulos íntegros ao longo dos tempos de infecção.....	44
Figura 9 -	Fotomicrografias de túbulos seminíferos normais e com alterações morfológicas nos grupos infectados.....	45
Figura 10 -	Representação da análise de integridade de membrana plasmática dos espermatozoides.....	46
Figura 11 -	Representação das alterações morfológicas encontradas nos espermatozoides sob análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
Figura 12 -	Gráficos de dispersão para as análises de IIS e ILS.....	52
Figura 13 -	Gráficos representando as alterações nos níveis dos marcadores de estresse oxidativo e enzimas envolvidas.....	54
Figura 14 -	Fotomicrografias da reação imunohistoquímica mostrando a marcação da proteína NS1.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados biométricos, histomorfométricos e estereológicos complementares.....	43
Tabela 2 -	Resultados das análises espermáticas.....	47
Tabela 3 -	Resultado do percentual dos componentes testiculares.....	50
Tabela 4 -	Resultado das análises de células de Leydig.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Au	Ouro
CAT	Catalase
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
CES	Ciclo do Epitélio Seminífero
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GST	Glutathione S-transferase
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IGS	Índice Gonadossomático
IHQ	Imunohistoquímica
IIS	Índice Intertubulossomático
ILS	Índice Leydigossomático
IM	Intramuscular
IP	Iodeto de Propídio
ITS	Índice Tubulossomático
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
MDA	Malondialdeído
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NO	Óxido Nítrico
SOD	Superóxido Dismutase
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μ	Micra
μm	Micrômetro
μL	Microlitro
μg	Micrograma
ng	Nanograma
π	Pi
$\%$	Por cento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	VÍRUS ZIKA E INFECÇÃO VIRAL.....	20
2.2	TESTÍCULO E PROCESSO ESPERMATOGÊNICO.....	22
2.2.1	Células de Sertoli.....	22
2.2.2	Células de Linhagem Espermato gênica.....	23
2.3	CÉLULAS DE LEYDIG E TESTOSTERONA.....	24
2.4	ESPERMATOZOIDE.....	25
2.5	EPIDÍDIMO.....	26
2.6	ZIKA E O SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	27
2.7	ESTRESSE OXIDATIVO.....	28
3	JUSTIFICATIVA.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	ANIMAIS E MANUTENÇÃO DO BIOTÉRIO.....	31
4.2	IMUNODEPRESSÃO FARMACOLÓGICA.....	31
4.3	INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA.....	32
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.5	EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	33
4.6	ANÁLISES HISTOLÓGICAS E HISTOMORFOMÉTRICAS.....	34
4.7	BIOMETRIA CORPORAL E TESTICULAR.....	34
4.8	MORFOMETRIA TESTICULAR.....	34

4.9	HISTOPATOLOGIA.....	35
4.10	COLETA DOS ESPERMATOZOIDES PARA AS ANÁLISES ESPERMÁTICAS.....	36
4.10.1	Motilidade Espermática.....	36
4.10.2	Integridade de Membrana.....	36
4.10.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	36
4.11	ESTRESSE OXIDATIVO.....	37
4.12	ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICA.....	37
4.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	BIOMETRIA CORPORAL, HISTOMORFOMETRIA E ESTEREOLOGIA TESTICULAR E ANÁLISES ESPERMÁTICAS.....	39
5.1.1	Biometria.....	39
5.1.2	Histomorfometria e Estereologia Tubular.....	41
5.1.3	Análises Espermáticas.....	45
5.1.4	Histomorfometria e Estereologia Intertubular.....	49
5.1.4.1	<i>Região Intertubular.....</i>	49
5.1.4.2	<i>Células de Leydig.....</i>	51
5.2	ESTRESSE OXIDATIVO.....	53
5.3	REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA.....	55
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICE A – DADOS SUPLEMENTARES - RESULTADO DO VOLUME DOS COMPONENTES TESTICULARES EM ML.....	71
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.....	73

1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika, causador de uma das infecções virais mais conhecidas atualmente, foi inicialmente descoberto e identificado em 1947, em um macaco Rhesus utilizado como sentinela na floresta Zika, em Uganda, continente africano (NEWMAN et al., 2017). Posteriormente este vírus se alastrou por outros países orientais, arquipélagos e ilhas, passando pela Malásia, Polinésia, Ilha de Páscoa, e, mais recentemente, no Brasil (ATIF et al., 2016; CHAN et al., 2016; TORRES et al., 2016), que ganhou destaque após o grande número de recém-nascidos com microcefalia (GULLAND, 2016; SHI et al., 2016; WU et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Alguns meses depois a malformação foi associada a infecção pelo vírus (PETERSEN et al., 2016), comprovada após testes de biologia molecular e imunológicos, como reações de RT-PCR e reação imunohistoquímica em humanos e em animais de laboratório.

Segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses*, o vírus Zika pertence a Família *Flaviviridae*. Este grupo abriga diversos arbovírus transmitidos por mosquitos vetores do gênero *Aedes*, com interesse médico, como os vírus da dengue, febre amarela, encefalite japonesa e do Nilo ocidental (SILVESTRE, 2017).

Com o aumento dos estudos sobre a infecção, foi visto que além do seu tropismo pelo tecido nervoso o vírus também possui afinidade pelo ambiente testicular, também comprovado por métodos de diagnóstico moleculares e imunológicos (GOVERO et al., 2016; MA et al., 2016). Desde então o potencial de transmissão através do contato sexual foi investigado, encontrando-se casos de pessoas infectadas que transmitiram o vírus para seus parceiros após o contato sexual sem o uso de preservativo (CHANG et al., 2016).

Após esta descoberta, mais trabalhos foram direcionados a compreender o efeito da infecção no órgão reprodutor masculino, avaliando-se parâmetros gerais como biometria, análise histopatológica dos túbulos seminíferos e avaliações hormonais em modelos animais.

Os diversos trabalhos publicados relatam alterações pertinentes, porém variáveis a depender da espécie e linhagem animal utilizada e da estirpe viral, sendo relatados alterações no peso corporal e testicular, inflamações e esterilidade nos indivíduos (MA et al., 2016). Visto que as linhagens de camundongos mais comumente utilizadas apresentam imunocompetência para o vírus Zika, outras linhagens se mostraram mais indicadas, apresentando resultados satisfatórios, como a C57BL/6, A129 e AG129 (MA et al., 2016;

LAZEAR et al., 2017). Estas linhagens citadas apresentam alterações nos genes que codificam a síntese de interferons, tornando-os indivíduos imunocomprometidos suscetíveis a infecções (ALIOTA et al., 2016; LAZEAR et al., 2017).

Apesar das pesquisas realizadas, ainda permanecem lacunas sobre o efeito da infecção sobre a estrutura testicular e a qualidade seminal, avaliando o estado morfofuncional dos tipos celulares que compõem o órgão. Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar a estrutura e a função testicular, a partir de análises morfológicas e morfométricas dos componentes testiculares, de análises de marcadores de estresse oxidativo e avaliação morfofuncional dos espermatozoides de animais infectados com o vírus Zika.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar, através de análise histomorfométrica e ultraestrutural as consequências da infecção pelo vírus Zika sobre o sistema reprodutor de camundongos machos de linhagem balb/c adultos imunodeprimidos com dexametasona.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a os efeitos da infecção pelo ZIKV sobre a morfologia do testículo através de análises biométricas e histomorfométricas;
- Avaliar morfológica e funcionalmente os espermatozoides produzidos pelos indivíduos infectados;
- Determinar, através de reação imunohistoquímica, quais tipos celulares são mais susceptíveis à infecção pelo ZIKV;
- Determinar o estresse oxidativo das células que compõem o testículo de animais infectados pelo ZIKV, através de marcadores como glutathione S-transferase, catalase, superóxido dismutase, óxido nítrico e malondialdeído.
- Avaliar, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a morfologia dos espermatozoides dos camundongos infectados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VÍRUS ZIKA E INFECÇÃO VIRAL

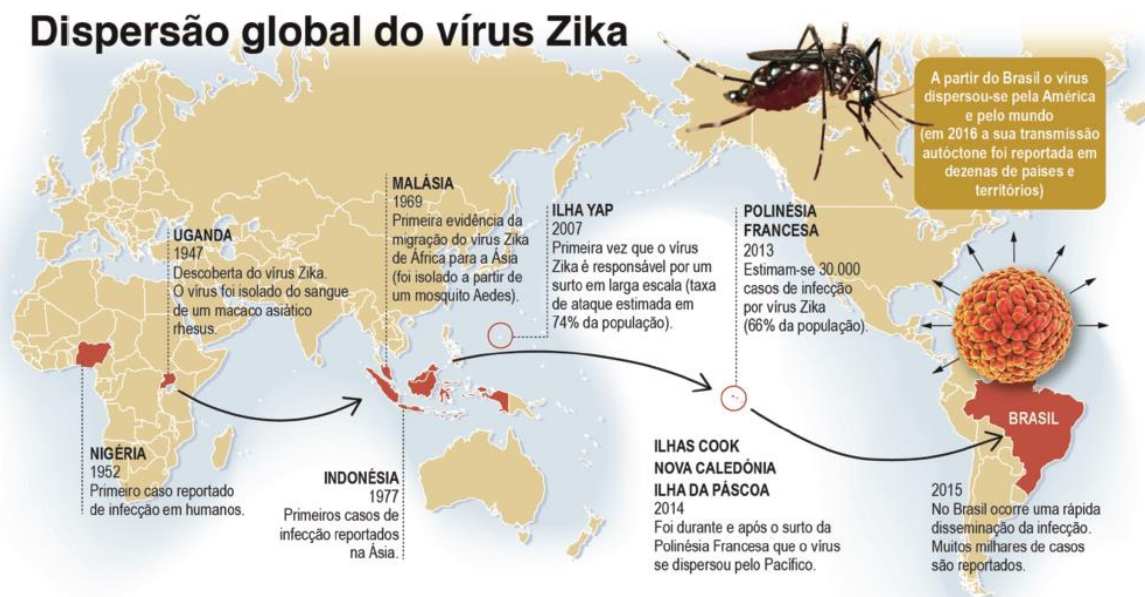
A família viral *Flaviviridae*, a qual pertence o ZIKV, é caracterizada pela semelhança no tamanho entre seus membros (Aproximadamente 50 nm), presença de um nucleocapsídeo icosaédrico e uma única fita positiva de RNA (SILVESTRE, 2017). A família é subdividida em quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivírus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*, sendo a família *Flavivirus* a responsável por incluir todos os Arbovírus (Do inglês *arthropod-born vírus*), incluindo o ZIKV, segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses*. (SILVESTRE, 2017).

No ano de 1947, na floresta Zika (Uganda), o vírus foi, pela primeira vez, encontrado no soro de um macaco rhesus utilizados como sentinela, em um monitoramento de febre amarela. Em 1948 o ZIKV foi também identificado e isolado no mosquito *Aedes africanus* e em 1954 houve o primeiro caso conhecido de humanos infectados, sendo esse uma menina de 10 anos de idade, na Nigéria (ARMSTRONG et al., 2017; CHAN et al., 2016; MACNAMARA, 1954 e NEWMAN et al., 2017).

Em 1966, na Malásia, o ZIKV foi isolado a partir de espécimes de *Aedes aegypti* e em 1977 em Java (Indonésia), houve casos de infecções humanas, representando os primeiros casos no continente asiático (DUONG et al., 2017; KINDHAUSER et al., 2016; NEWMAN et al., 2017). Ainda segundo os autores, no continente africano alguns casos sem grande repercussão foram identificados na segunda metade do século XX.

O primeiro grande surto de ZIKV foi registrado na ilha Yap (Micronésia) em 2007, onde inicialmente acreditou-se ser uma epidemia do vírus da dengue (DENV) (KINDHOUSER et al. 2016; BAUD et al. 2017; DOUNG et al. 2017; NEWMAN et al., 2017). Segundo eles, em 2013, houve outro surto na Polinésia Francesa. Em 2014 o ZIKV foi detectado nas Ilhas Cook, Páscoa e na Nova Caledónia, que logo se disseminou pelo oceano pacífico, atingindo o continente americano (ATIF et al., 2016; CHAN et al., 2016; TORRES et al., 2016) (Figura 1).

Figura 1 – Infográfico sobre a dispersão global do ZIKV ao longo dos anos desde seu primeiro relato em 1947.



Fonte: Brogueira e Miranda, 2017 (Adaptado).

Nos anos de 2015 e 2016 a América Central e do Sul enfrentaram um surto de ZIKV, passando esta a ser considerada uma epidemia e um problema para a saúde pública mundial, despertando a atenção pública internacional (GULLAND, 2016; SHI et al., 2016; WU et al., 2016; ZHANG et al., 2016)

O Brasil foi um dos países que ganhou destaque com o número de pessoas infectadas, com mais de 130 mil casos confirmados do início de 2016 até a semana epidemiológica 52 (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2017). Além da transmissão vetorial, outras vias foram registradas para o ZIKV durante a epidemia no Brasil, através do contato sexual, via transmissão vertical (Mãe-filho) e de transfusão sanguínea (POSSAS et al., 2017).

A transmissão através do contato sexual foi registrada em casais que se relacionaram sexualmente sem uso de preservativo, após um deles ter regressado de viagem de áreas endêmicas, com registros de transmissão (HAMER et al., 2017). Nos casos de mulheres grávidas infectadas com o ZIKV, verificou-se que havia carga viral no líquido amniótico, placenta, tecido cerebral e sanguíneo, o que sinalizou a relação entre o vírus e os casos de microcefalia no Brasil no ano de 2016 (PETERSEN et al., 2016).

Em um estudo realizado por Uraki e colaboradores (2017), verificou-se que o testículo, órgão responsável por produzir os gametas masculinos (RUSSELL et al., 1990), é um dos órgãos que sofre alterações morfológicas devido à infecção pelo ZIKV. Ele constatou, após

testes experimentais utilizando camundongos, que houve atrofia testicular e infecção seminal, corroborando para a correlação da via de transmissão sexual.

2.2 TESTÍCULO E PROCESSO ESPERMATOGÊNICO

Os testículos são as gônadas masculinas onde, nos mamíferos, estão normalmente dispostos dentro da bolsa escrotal, um em cada compartimento separados pelo septo do escroto. São encarregados de duas funções principais: a produção de espermatozoides e a síntese hormonal (RUSSELL et al., 1990). Ambos são revestidos pela túnica albugínea, formada por tecido conjuntivo do tipo denso (SETCHELL, 1991), onde se invagina em direção ao mediastino do testículo, dividindo-o internamente em pequenos lóbulos. Cada destes possui de 1 a 4 túbulos seminíferos enovelados e tecido intersticial preenchendo toda a região entre eles (RUSSELL et al., 1990).

Os túbulos seminíferos preenchem os testículos juntamente com as células intersticiais, presentes na região intertubular, são elas as células de Leydig, macrófagos, mastócitos e fibroblastos. Outros elementos também compõem esta região, como os vasos sanguíneos, os nervos e os vasos linfáticos (RUSSELL et al., 1990; SETCHELL, 1991).

O túbulo seminífero é formado por um tipo especial de tecido epitelial, denominado epitélio seminífero, que repousa sobre uma lâmina basal (JUNQUEIRA, 2013). Este é constituído por uma variedade de células que se dispõem de forma ordenada da lâmina basal do túbulo até a sua última camada, em contato com o lúmen. Os tipos celulares encontrados podem ser agrupados em células somáticas, como as células de Sertoli, e as células de linhagem espermatogênica, como as espermatogônias, espermátócitos primários, espermátócitos secundários, espermátides arredondadas e espermátides alongadas (RUSSELL et al., 1990). Além das células citadas, externamente, em contato com a lâmina basal, existem células musculares lisas, denominadas de miócitos que auxiliam na condução dos espermatozoides gerados em direção aos ductos eferentes, através de sua contração (KARL & CAPEL, 1998; CAPEL, 2000; RUSSELL et al., 1990).

2.2.1 Células de Sertoli

As células de Sertoli são células de origem somática, que embora não participem da formação dos gametas, são responsáveis por dar suporte as células que participarão de todo o processo (RUSSELL, 1980). Segundo Russel (1990) este é o tipo celular predominante nos túbulos até a adolescência, que perde espaço para as demais células somente após estímulo da testosterona que tem sua secreção aumentada neste período, através das células de Leydig.

Ainda segundo Russel (1990), de forma geral, as células de Sertoli possuem um núcleo tripartido com massas de heterocromatina associadas umas às outras, observáveis ao microscópio. Estão distribuídas na periferia dos túbulos seminíferos e se estendem até o lúmen, onde emitem projeções em toda sua extensão em direção as demais células (RUSSELL, 1980). Ancoram-se com a lâmina basal através de junções celulares do tipo aderentes e junções comunicantes, além de unirem-se entre si através de junções celulares do tipo oclusiva (tight junctions), formando a chamada barreira de célula de Sertoli (CHENG & MRURK, 2002).

Este tipo celular possui como função dar suporte as células de linhagem espermatogênica, nutrindo e dando suporte físico através de interações complexas, física e quimicamente. Também são responsáveis por secretar substâncias importantes, como fatores de crescimento, proteínas e o fluido testicular, que serve como veículo para os espermatozoides atuando também na maturação espermática (CARREU et al., 1999; HESS, 2000).

2.2.2 Células de Linhagem Espermatogênica

As células de origem espermatogênica se originam da espermatogônia, um tipo celular diploide que sofre sucessivas divisões gerando células que continuam o processo de diferenciação, os espermatócitos primários. Outras espermatogônias também são geradas, mantendo constante o número dessas no compartimento basal do túbulo seminífero. As espermatogônias são agrupadas em categorias, onde na primeira pode-se identificar as Espermatogônias Isoladas (AIs), Pareadas (APr) e Alinhadas (AAI), sendo as AIs consideradas como células tronco do testículo (CHIARINI-GARCIA & RUSSELL, 2001). A segunda categoria agrupa as espermatogônias do tipo A, intermediárias (In) e do tipo B, responsáveis por dar seguimento ao processo e originar os espermatozoides (CHIARINI-GARCIA & RUSSELL, 2001). O número de divisões sofridas por elas varia, sendo espécie-específica, onde nos ratos e camundongos se divide nove vezes, podendo formar até 4100 espermatozoides (RUSSELL et al., 1990).

Segundo Junqueira (2013) os espermatócitos primários e secundários são os estágios seguintes do processo iniciado pela espermatogônia. Essa, após processos repetidos de divisão mitótica, gera diversas novas células, onde parte se mantém na base do túbulo seminífero, fazendo a manutenção do epitélio germinativo e outra continua o processo de diferenciação, tornando-se espermatócito primário. O espermatócito primário entra em processo de divisão

meiótica, onde cada célula, após a meiose I, formará dois espermatócitos secundários que, após a meiose II, formarão mais duas células, denominadas espermátides arredondadas.

As espermátides arredondadas se modificam morfológicamente de forma gradativa, até se transformarem em espermátides alongadas. Estas formam o último estágio até o processo de espermição, onde há a liberação das células no lúme do túbulo seminífero, contudo, para que isso ocorra, esta célula desenvolve um flagelo longo voltado para o lúme e o complexo de Golgi se funde e se posiciona no lado oposto formando o acrossomo (KIERZENBAUM & TRES, 2016). Além destas modificações, ocorre também a liberação do excesso de citoplasma e membrana plasmática, chamado de corpo residual, e a condensação da cromatina (JUNQUEIRA, 2013; KIERZENBAUM & TRES, 2016).

Nem sempre é possível observar todos os tipos celulares descritos em um corte transversal do túbulo seminífero. Cada região do túbulo varia na disposição dos tipos celulares, característica denominada de estágio. Esse sofre alterações com o passar do tempo, de acordo com o processo de diferenciação das células de linhagem gamética através do chamado Ciclo do Epitélio Seminífero (CES) (RUSSELL, 1990; FRANÇA, 1991; GONDINHO, 1999). O CES pode ser classificado em estádios, que variam de acordo com a espécie a depender do método de estudo aplicado. Um deles toma como base as características morfológicas (BERNDTSON, 1977; FRANÇA & RUSSELL, 1998) e outro que utiliza o método acrossômico (LEBLOND & CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990).

De acordo com o método morfológico o CES pode ser classificado em 8 estádios distintos (BERNDTSON, 1977; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Em outras palavras, cada região dos túbulos seminíferos passa pelos oito estádios ao longo do tempo, repetidas vezes. Este ciclo possui duração variável de acordo com a espécie, sendo de 42 dias em camundongos (FRANÇA et al., 1998).

2.3 CÉLULAS DE LEYDIG E TESTOSTERONA

As células de Leydig surgem ainda durante o desenvolvimento embrionário do indivíduo, atuando no controle do desenvolvimento das estruturas sexuais primárias, devido às secreções altas de testosterona (PELLINIEMI et al., 1996). Visto sua função, essas células possuem em seu interior o retículo endoplasmático aumentado, contendo também em seu citoplasma gotículas de lipídios contendo colesterol, molécula base para a produção da testosterona e dos demais hormônios esteroidais conforme descrito por Bardin (1996).

As células de Leydig voltam a secretar testosterona no indivíduo após os 11 anos de idade aproximadamente, porém em doses menores do que as secretadas no período embrionário (BLUE, 1999; SHAHID, 2001). Nesta fase as células de Leydig presentes no parênquima testicular não são da mesma linhagem das células presentes na fase embrionária, mas sim de células precursoras mesenquimáticas. O esteroide recém-sintetizado em questão, a testosterona, atuará no desenvolvimento das características masculinas secundárias do indivíduo durante a puberdade (SHARPE, 1994).

A testosterona circulante no indivíduo adulto é produzida de forma mais expressiva pelos testículos em homens e nos ovários na mulher, contudo uma pequena fração pode ter origem no córtex das glândulas suprarrenais em ambos os sexos (SMITH et al., 1985). No indivíduo adulto de sexo masculino a dose sérica de testosterona varia entre 300 e 1.000ng/dl, sendo a produção diária entre 2,5 e 11mg (FERREIRA, 2007). De acordo com Snyder (1999) após os 80 anos de idade a produção e a dosagem séria da testosterona declinam, atingindo valores próximos a metade da concentração em indivíduos com 20 anos.

2.4 ESPERMATOZOIDE

Os espermatozoides são células que compõem o ejaculado, uma suspensão celular viscosa composta por diversos tipos de proteínas, lipídios e carboidratos, denominada de plasma seminal (GARNER e HAFEZ, 2004). Ainda segundo o autor, esta mantém um meio adequado para a proteção e nutrição dos espermatozoides, além de servir como um veículo para os gametas dentro trato genital feminino.

Possui morfologia característica, tendo, segundo Jonge e Barrat (2006) duas regiões principais: A cabeça e a cauda. A cabeça é onde se localiza o núcleo celular, onde está o material genético haploide (n) do indivíduo, além do material citoplasmático delimitado pela membrana celular. Nela também é encontrada o acrossomo, organela resultante da fusão das cisternas do complexo de Golgi, contendo diversas enzimas digestivas em seu interior, principalmente a hialuronidase e a acrosina (FLESCHE e GADELLA, 2000; ASHIZAWA et al., 2004; GARNER e HAFEZ, 2004).

Por fim, a cauda é formada por um flagelo de origem proteica, possuindo em seu interior uma estrutura denominada axonema. Essa estrutura é composta por nove microtúbulos duplos e um par central, onde cada túbulo se adere com seu par através das proteínas dineínas e nexinas. As dineínas possuem projeções, denominadas braços, que são

responsáveis pela geração da força motora do flagelo, onde converte energia química em energia cinética, permitindo que pares de túbulos deslizem um sobre o outro, causando curvaturas no filamento, resultando no então movimento flagelar (BARTH e OKO, 1989; MORTIMER, 1997; TURNER, 2006).

Segundo Jonge e Barrat (2006) a cauda é composta por três regiões: A peça intermediária, que comporta as mitocôndrias da célula de forma organizada e estrategicamente alinhadas, a porção principal e a peça principal. Ainda segundo os autores, estas realizam intensamente a respiração celular, liberando energia para que haja movimentação do flagelo e a célula consiga atingir a motilidade adequada.

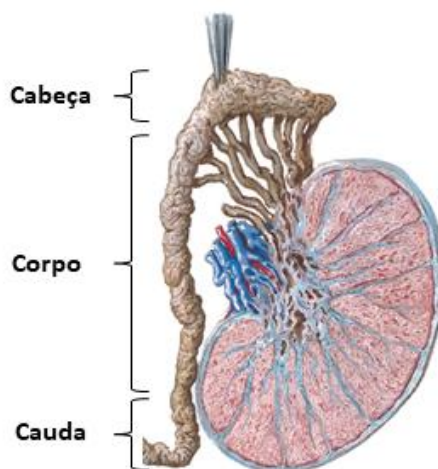
Após sua formação nos túbulos seminíferos estes seguem em direção aos ductos eferentes que se continuam para formar os epidídimos. Após a espermição, o então espermatozoide está morfológicamente formado, contudo, não está funcionalmente ativo. Esta característica é desenvolvida após sua passagem pelo epidídimo, que é alcançado após a passagem destas células pelos ductos eferentes onde acessam a cabeça do órgão. Seguindo os ductos do epidídimo, através da propulsão realizada pelo órgão, alcançam o corpo e, por fim, a cauda do epidídimo, normalmente já maduros e ativos (MOORE, 2016).

2.5 EPIDÍDIMO

O epidídimo, segundo Domeniconi e colaboradores (2016) é um órgão formado por túbulos enovelados, denominados ductos do epidídimo, revestido por uma túnica formada por tecido conjuntivo denso. Ainda segundo o autor, nos mamíferos, normalmente, está presente em número de dois, estando cada um em íntimo contato com os testículos em sua margem posterior, podendo ser dividido morfológicamente em três regiões principais, a cabeça, o corpo e a cauda (Figura 2).

Tem como função realizar a maturação e o armazenamento dos espermatozoides em sua porção final (cauda), até o momento da ejaculação, quando o fluido com as células em suspensão é impulsionado em direção ao pênis (COSENTINO & COCKETT, 1989; HERMO E ROBAIRE, 2002; GATTI et al., 2004).

Figura 2 – Anatomia do epidídimo com a indicação aproximada das suas partes: Cabeça, corpo e cauda do epidídimo



Fonte: Netter, 2018 (Adaptado)

2.6 ZIKA VÍRUS E SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O primeiro relato de uma possível infecção via sexual pelo vírus Zika foi em 2011, quando um pesquisador, que desenvolvia suas atividades no ano de 2008, em Bandafassi, Senegal, retornou para seu país de origem, os Estados Unidos da América. Pouco tempo depois ele e sua esposa apresentaram sintomatologia da doença. Após anamnese, onde constatou-se que o casal havia realizado o ato sexual sem o uso de preservativo, foi considerado a hipótese de que o vírus foi transmitido por via sexual, tendo o ejaculado atuado como veículo para o vírus, visto que a mulher não havia saído do país recentemente (CHANG et al., 2016; HAMER et al., 2017; MUSSO & GUBLER, 2016; PASSI et al., 2017; RELICH & LOEFFELHOLZ, 2017). Ainda segundo os autores, embora o fluido espermático não tenha sido submetido a testes, ambos pacientes tiveram o diagnóstico confirmado por testes sorológicos. Além da transmissão entre casais heterossexuais, houve também registro de um caso de transmissão entre um casal homoafetivo masculino confirmado por RT-PCR, sustentando a hipótese da presença de carga viral no fluido espermático (DECKARD et al., 2016; SMITH et al., 2016). Apenas entre 2015 e 2018 nos Estados Unidos houve o registro de 52 casos de transmissão sexual do vírus segundo o CDC, incluindo um caso de infecção de uma mulher grávida, segundo (OLIVEIRA et al., 2016; DESCLAUX et al., 2018). Com o avanço dos estudos, principalmente os experimentais utilizando murinos, comprovou-se que,

de fato, o vírus se encontra no sistema reprodutor masculino, podendo ser transmitido através dos espermatozoides (FOY et al., 2011; D'ORTENZIO, 2016). Assim, a transmissão por essa via se encontra atualmente bem estabelecida na literatura (MLERA & BLOOM, 2019).

Em camundongos, principal modelo utilizado nas pesquisas experimentais, observou-se que o vírus infecta diferentes locais do sistema reprodutor masculino a depender da linhagem utilizada. De forma geral, foi comprovado que o vírus Zika é capaz de infectar as glândulas seminais, a próstata, os epidídimos e, principalmente, os testículos (MA et al., 2016), causando danos a sua morfologia, desencadeando uma cascata de danos no indivíduo (MA et al., 2016; CHAD et al., 2017; SEHNG et al., 2017).

No que se refere a persistência do vírus no sêmen, Peregrine e colaboradores (2019) observaram em um experimento com babuínos anúbis que, após 41 dias ainda, havia RNA viral detectável no sêmen. Ele mostrou que o vírus permanece no sistema reprodutor por um longo período até a fase indetectável. Já em humanos, Gaskell e colaboradores (2019) observaram o RNA viral no sêmen até o 92º dia desde o início dos sintomas.

2.7 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é definido como sendo um conjunto de eventos moleculares que alteram a capacidade das células de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ERO), conforma descrito por Sies (1985). Segundo Sies e colaboradores (1997) as células possuem uma série de enzimas que atuam no controle destas espécies reativas, afim de tornar o ambiente celular estável. Os alimentos consumidos, tratamentos farmacológicos e infecções virais, são situações em que os níveis de espécies reativas podem ser alteradas, afetando positiva ou negativamente o metabolismo celular (BRASILEIRO-FILHO, 2016).

As EROs são radicais resultantes do metabolismo celular, onde, nos processos que envolvem as moléculas de oxigênio ou nitrogênio, são formados compostos intermediários instáveis que podem se desligar da cascata da reação em que estão envolvidos e se dispersarem no ambiente celular (GODIC et al., 2014). Sua instabilidade se deve, normalmente, a um elétron desemparelhado em sua camada de valência, fazendo com que possa interagir com diversas moléculas, como lipídios e proteínas (RIBEIRO et al., 2005; BRASILEIRO FILHO, 2016).

Das principais enzimas, existem a glutathione S-transferase (GST), a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), sendo estas duas últimas atuando em sequência na neutralização de alguns compostos (RIBEIRO et al., 2005). Além destas enzimas existem algumas moléculas que podem ser usadas como marcadores do estresse oxidativo, como o malondialdeído (MDA) e o óxido nítrico (NO) (JANERO, 1990; RICART-JANÉ et al., 2002; DROGE, 2002).

O radical superóxido (O^{2-*}) gerado em reações metabólicas é convertido de forma enzimática pela SOD em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DROGE, 2002). Esta, por ser tóxica ao organismo, é novamente submetida a ação enzimática, desta vez pela CAT que a transforma em H_2O e O_2 (AEBI, 1984). A enzima GST, segundo Frova (2003) faz parte de uma superfamília de proteínas presentes em espécies de organismos aeróbios. Possui como função catalisar a reação do tripeptídeo glutathione (GSH; γ -glutamyl-cisteina-glicina) juntamente com compostos xenobióticos, hidrofóbicos ou endógenos, que podem oferecer riscos a saúde do organismo, como reações de toxicidade e/ou risco carcinogênico (AMES et al., 1990; DIXON et al., 2002; MEISTER & ANDERSON, 1983). Estes compostos normalmente são derivados da peroxidação de lipídios, que, por efeito da GST, tornam-se mais solúveis em água (HABIG et al., 1974; HERMES-LIMA, 2004).

O MDA é um dos produtos resultantes da peroxidação de lipídios, podendo ser utilizado como um marcador do estresse oxidativo (JANERO, 1990). Além deste, outra molécula utilizada como um marcador bioquímico é o óxido nítrico (NO), molécula de tamanho reduzido envolvida em processos anti-inflamatórios, de neurotransmissão e no relaxamento da musculatura lisa (RICART-JANÉ et al., 2002; DROGE, 2002).

No processo de maturação dos espermatozoides uma quantidade reduzida de EROS é fundamental para a motilidade da célula no processo denominado capacitação, contudo, o aumento ou a redução destas espécies podem alterar as funções dos espermatozoides como a perda da motilidade e a disfunção de organelas citoplasmáticas (FALLAHI et al., 2015), podendo inviabilizar estas células através do seu comprometimento estrutural e/ou funcional.

3 JUSTIFICATIVA

Embora diversos trabalhos relacionados à análise testicular em modelos animais infectados com o vírus Zika tenham sido publicados, poucos trazem informações acerca das possíveis alterações na organização tecidual desse órgão. Apesar do volume de publicações, estas, quando se referem ao estado morfológico do órgão, se limitam a indicar alterações biométricas e histopatológicas gerais. Dados como alterações no peso corporal e testicular, atrofias em regiões específicas do testículo e avaliações descritivas sobre a organização geral do órgão são evidenciados, mas pouco se sabe sobre as alterações em cada um de seus componentes e qual a repercussão sobre a função testicular.

Desta forma, este trabalho buscou evidenciar os efeitos da infecção pelo vírus Zika sobre as células que compõem o parênquima testicular e sobre os espermatozoides de camundongos infectados, buscando preencher lacunas presentes sobre o potencial do vírus no ambiente testicular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E MANUTENÇÃO DO BIOTÉRIO

Foram utilizados 120 camundongos de linhagem balb/c, machos, em idade reprodutiva (50 dias de idade). Os animais foram obtidos no biotério do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ/PE) e mantidos durante toda a fase experimental no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE). Os 120 camundongos foram distribuídos em microisoladores (n=4/gaiola) (Figura 3), dispostos em estante ventilada, com controle de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), iluminação (12h claro/12h escuro), dieta do tipo Labina®, maravalha esterilizada e água filtrada *ad libitum*.

Figura 3 – Camundongos em microisoladores dispostos em estante ventilada (Alesco®) – Biotério LIKA/UFPE.



Fonte: O autor.

O projeto foi executado de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e após parecer favorável do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE, registrado com protocolo nº. 0049/2018.

4.2 IMUNODEPRESSÃO FARMACOLÓGICA

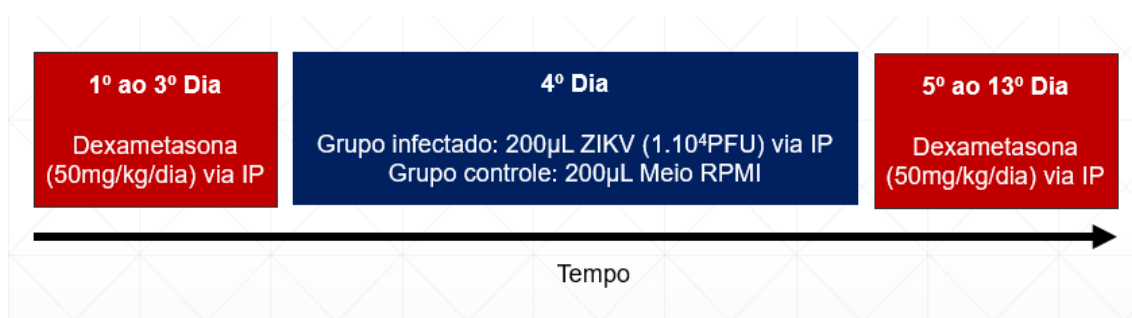
Os animais foram submetidos ao protocolo de imunodepressão com Dexametasona (FARMADEX®), conforme realizado por Chan e colaboradores (2016), numa concentração de 50mg/kg/dia. Desta forma o protocolo teve duração de doze dias, onde os animais

receberam doses diárias via intraperitoneal, iniciando-se três dias antes da infecção pelo vírus Zika, e finalizado durante os nove dias após a infecção. A imunodepressão foi confirmada após a contagem global de leucócitos em câmara de Neubauer, onde verificou-se o baixo índice ou mesmo ausência de leucócitos circulantes no sangue periférico dos camundongos utilizados no estudo, quando comparado com animais não tratados.

4.3 INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA

No terceiro dia de experimento os animais pertencentes aos grupos infectados receberam, com o auxílio de uma seringa de insulina, o vírus Zika (ZIKV PE243) via intraperitoneal (IP) numa concentração de 1×10^4 PFU suspensos em 200 μ L de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Antibiótico (Penicilina/Streptomicina). A ilustração abaixo representa o protocolo descrito.

Figura 4 – Protocolo de imunodepressão farmacológica com dexametasona e infecção por ZIKV



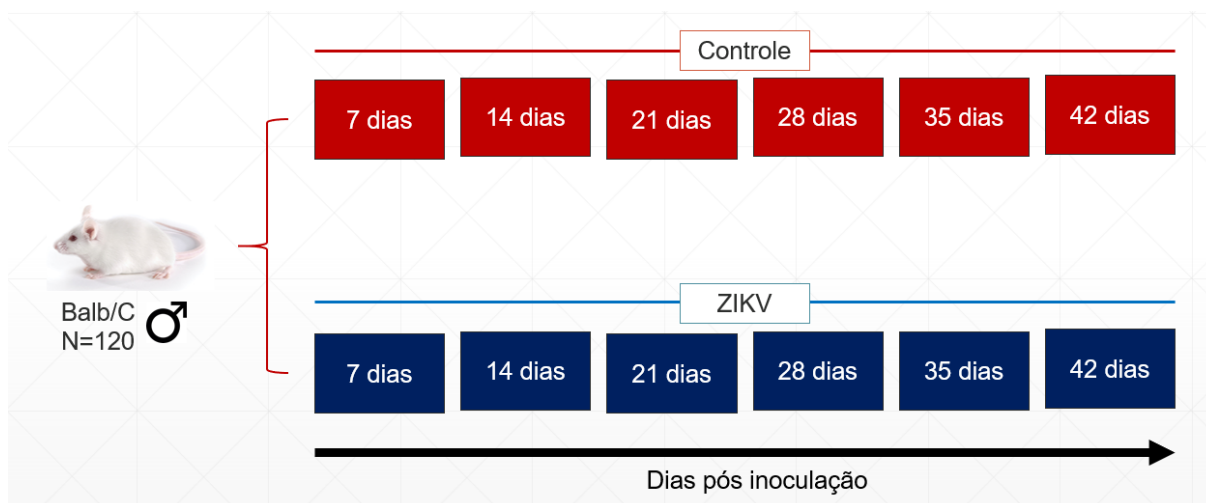
Fonte: O autor

Os grupos controles receberam pela mesma via 200 μ L do meio de cultura suplementado com os mesmos componentes nas mesmas concentrações, porém sem o vírus.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os 120 camundongos utilizados neste estudo foram distribuídos em 12 grupos (n=10/grupo), sendo 6 grupos controle e 6 grupos infectados, conforme ilustrado abaixo.

Figura 5 – Ilustração do delineamento experimental



Fonte: O autor.

Legenda: Controle – Grupos de animais controle; ZIKV – Grupos de animais infectados com vírus Zika numa concentração de 1×10^4 PFU.

Após a infecção, um grupo controle e um grupo infectado foram eutanasiados a cada semana, nos tempos de 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a infecção.

4.5 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Finalizado o tempo experimental, designado a cada grupo, os animais foram pesados e anestesiados via intramuscular com associação anestésica de xilazina (10mg/kg) e cetamina (115mg/kg) recebendo posteriormente, via intraperitoneal, tiopental sódico (30mg/Kg). Após realizados os testes de reflexos a estímulos e atingido o plano anestésico foi procedida a toracotomia com o animal posicionado em decúbito dorsal e, posteriormente, a punção cardíaca para obtenção do sangue total. Após realizada a punção, o animal foi submetido ao guilhotinamento para a certificação da morte rápida, visto que após a coleta de grande volume de sangue o indivíduo entra em choque hipovolêmico.

Em seguida, os testículos e epidídimos dos 10 animais foram coletados, pesados e processados de acordo com as análises. Seis animais foram destinados para as análises histológicas e de estresse oxidativo. Para as análises histológicas de morfometria os espécimes foram imersos em solução fixadora de Bouin/Picroformaldeído e para as análises estresse oxidativo os testículos foram coletados, acondicionadas em microtubos e armazenados em nitrogênio líquido para congelamento imediato. Os demais animais (4) foram destinados para as análises imuno-histoquímicas, MEV, pH, motilidade, morfologia e viabilidade espermática. Para imunohistoquímica os testículos e epidídimos foram imersos em formalina tamponada a

10% durante 48h até o início do processamento das amostras. Para as análises de pH do fluido espermático, motilidade espermática e integridade de membrana dos espermatozoides os epidídimos foram imersos em solução de TRIS-Cítrico-Frutose. Para a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos espermatozoides o fluido espermático foi homogeneizado e armazenada em solução fixadora de Karnovsky durante 24h a 8°C.

4.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E HISTOMORFOMÉTRICAS

Os testículos foram fixados por imersão em Solução de Picroformaldeído ou Solução de Bouin durante 24 horas. Posteriormente foram seccionados em fragmentos de 3mm e armazenados em álcool etílico 70% até o processamento histológico. Em seguida o material foi desidratado em séries crescentes de etanol e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Germany). Secções semisseriadas de 3µm, com intervalos de 39µm, foram obtidas em micrótomo rotativo semi automático Leica Reichert Jung e coradas com azul de toluidina (0,5%) e borato de sódio (1%). As lâminas foram fotomicrografadas em microscópio Axio (Imager.M2m/Zeiss), acoplado a uma câmera (AXIOCam HRc/Zeiss), conectado ao software de captura ZEN 2 PRO (Blue edition). As imagens capturadas foram processadas e analisadas através do software Image J 1.50i (National Institute of Health, USA).

4.7 BIOMETRIA CORPORAL E TESTICULAR

Os testículos foram pesados em balança de precisão (BEL Mark 160/0.0001g). Para determinar o peso do parênquima testicular a albugínea foi retirada e pesada, descontando-se seu peso daquele obtido para o testículo inteiro. Baseado no peso corporal, obtidos após pesagem em balança de precisão (PRIX LAB TOLEDO 2100/0,01g) minutos antes da eutanásia, e do peso testicular, foi calculado o índice gonadossomático (IGS, %) a partir da divisão do peso testicular pelo peso corporal e multiplicado por 10052. O índice parenquimossomático (IPS, %) foi determinado pela divisão do peso do parênquima testicular pelo peso corporal e multiplicado por 100 (AMANN, R. 1970).

4.8 MORFOMETRIA TESTICULAR

A proporção volumétrica de túbulos seminíferos foi estimada a partir da contagem de 266 pontos em 10 campos aleatórios, totalizando 2.660 pontos para cada animal. O volume

(mL) de cada componente testicular foi estimado considerando o percentual ocupado por cada constituinte multiplicado pelo volume do parênquima testicular. Como o resultado da densidade do testículo de mamíferos é em torno de 1 ($d=m/v$) a massa do testículo foi considerada igual ao seu volume (TAE et al., 2005).

O índice tubulossomático (ITS) foi calculado dividindo-se o volume de túbulo seminífero pelo peso corporal x 100. O índice epiteliossomático (IES) foi obtido pela divisão do volume do epitélio seminífero dividido pelo peso corporal multiplicado por 100.

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível, sem considerar a fase do ciclo do epitélio seminífero. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero (média de duas medidas diametralmente opostas).

Foram calculadas as áreas tubular (ART), luminal (ARL) e epitelial (ARE), de acordo com as fórmulas: $ART = \pi \cdot RT^2$, onde RT= raio tubular; $ARL = \pi \cdot RT^2$, onde RT= raio luminal; $ArE = ArT - ArLU$ e a Relação T/E= $ArT - ArE$ (DIAS et al., 2019).

O comprimento total dos túbulos seminíferos, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelo mesmo nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal ($CTS = \text{Volume tubular} / \text{Área do túbulo} \times 1000000$). O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da fórmula: $CTS/g = \text{Comprimento total de túbulos} / \text{Peso bruto dos testículos (g)}$, conforme descrito por Dorst (1974).

4.9 HISTOPATOLOGIA

Para se estimar as proporções de túbulos seminíferos normais e patológicos, foram contados 200 túbulos, em campos aleatórios, nas preparações histológicas do testículo de cada animal. Foram considerados túbulos com patologias aqueles que apresentavam alteração morfológica (CREASY, 2003; RUSSEL et al, 1990; BOEKELHEIDE, 2005). De acordo com Johnsen existem 10 níveis de alterações, que são expressos em números. Neste trabalho foi usado o escore de Johnsen (1970) modificado por Dias e colaboradores (2019) para 8 níveis: **Nível 1-** Túbulo íntegro, com células germinativas dispostas no seu sítio de localização normal e poucos vacúolos; **Nível 2-** Vacúolos na base do epitélio; **Nível 3-** Vacúolos no ápice do epitélio; **Nível 4-** Vacúolos na base e no ápice do epitélio; **Nível 5-** Células espermatogênicas no interior do lúmen e presença de células em processo de degeneração; **Nível 6-** Túbulos apenas células basais; **Nível 7-** Túbulos apenas células de Sertoli; **Nível 8-**

Túbulos seminíferos desprovidos de células de Sertoli ou germinativas, caracterizando um estado irreversível de degeneração. Esses níveis foram agrupados em normal (nível 1), leve (Níveis 2 e 3), moderado (Níveis 4 e 5) e severo (Níveis 6,7 e 8).

4.10 COLETA DOS ESPERMATOZOIDES PARA AS ANÁLISES ESPERMÁTICAS

Após a eutanásia o epidídimo dos animais foi coletado e seccionado entre o corpo e a cauda. Em seguida a cauda foi mergulhada em 200µL de solução aquecida a 37°C de TRIS-Cítrico-Fructose e clivada diversas vezes com o auxílio de dois bisturis até a obtenção de um fluido capaz de ser manipulado por uma micropipeta. Após a clivagem foi retirada uma alíquota de 10µL para cada análise em microscopia ótica.

4.10.1 Motilidade Espermática

Para análise da motilidade uma alíquota de 10µL foi adicionada a uma câmara de Neubauer imediatamente após a coleta, onde contou-se o número de espermatozoides ativos e imóveis em quatro campos distintos. Ao final obteve-se a média por animais e os resultados foram expressos em porcentagem.

4.10.2 Integridade de Membrana

Para avaliar a integridade de membrana dos espermatozoides foi utilizada uma solução fluorescente com dois marcadores, o Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e o Iodeto de Propídio (IP). Uma alíquota de 10µL foi adicionada em um microtubo contendo 50µL da solução fluorescente, onde permaneceu durante duas horas até a leitura.

Para a análise uma alíquota de 10µL da suspensão foi montada em uma lâmina de vidro para microscopia e levada a microscópio de fluorescência. Foram contados 200 espermatozoides num aumento de 400x, sendo classificados em três categorias: íntegros (Marcados apenas com CFDA), lesados (Marcados apenas com IP) e semi-lesados (Marcados duplamente: CFDA + IP). Ao final da contagem obteve-se a média por grupo e os resultados foram transformados em porcentagem de espermatozoides íntegros.

4.10.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os fluidos obtidos após clivagens sucessivas da cauda dos epidídimos foram fixados em solução Karnovsky e armazenados em geladeira (5°C) até o início do processamento. A preparação do material foi realizada de acordo com o protocolo padrão do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da UFPE. A amostras

foram montadas em lamínulas pré tratadas com solução poly-L-lysina, metalizadas com ouro (Au) e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Modelo JEOL 5600 LV) do Instituto Aggeu Magalhães.

4.11 ESTRESSE OXIDATIVO

Os testículos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento da análise. Inicialmente as amostras foram descongeladas sobre gelo e então homogeneizadas em tampão de fosfato de potássio (pH 7,4, 0,2M), contendo EDTA 1M, utilizando um homogeneizador (OMNI) e centrifugadas (13,800g a 4°C durante 10min). O sobrenadante foi utilizado para a seguinte análise: enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST); concentração de óxido nítrico (NO) e marcador de estresse oxidativo Malondialdeído (MDA). Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. As análises foram realizadas em duplicata. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas por duplicata usando o leitor ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada indiretamente, através do teor de nitrito pela reação de Griess padrão (RICART-JANÉ et al, 2002). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi mensurada através do protocolo de Siddiqui e colaboradores (2005). A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela taxa de queda da absorbância, em 60 segundos, do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (AEBI, 1984) e a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Os níveis de malondialdeído (MDA) que é o resultado da peroxidação lipídica, foram determinados utilizando-se solução TBARS (ácido tricloroacético 15% / ácido tiobarbitúrico 0,375% / ácido clorídrico 0,25M). Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO) (WALLIN et al, 1993).

4.12 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a IHQ os testículos foram fixados em formalina tamponada a 10% (pH 7,4) durante 48h. Após o período de fixação os espécimes foram desidratados em etanol em concentrações crescentes (70 – 100%), diafanizadas em xileno (Xilol) e infiltradas com parafina histológica (NEON®). Cortes de 4µm foram obtidos através de micrótomo rotativo (LEICA RM2125RT) e preparados em lâminas silanizadas (Knittel Glass, Starfrost®).

Para os ensaios foi utilizado o método indireto com fosfatase alcalina. Os cortes preparados em lâminas silanizadas foram levados a estufa durante 6 horas para adesão do material à lâmina e desparafinização, em seguida banhadas três vezes em xileno, durante cinco minutos cada, seguindo para cinco banhos de álcool etílico absoluto de cinco minutos cada, um minuto em água corrente e um minuto em água deionizada. Posteriormente foi realizada a recuperação antigênica através do calor com as lâminas foram imersas em solução tampão EDTA (Biocare®, Concord, CA, EUA) em 0,6M TRIS CaCl₂ a 0,1% por 15 minutos no descompressor (Riptide, Celerus Diagnostics®) por 30 segundos a 110° C. Após as lâminas atingirem a temperatura ambiente seguiu-se com o protocolo.

Posteriormente os cortes receberam o bloqueador Background Punisher (Biocare Medical) por 10 minutos e em seguida foram encubados com o anticorpo policlonal primário Anti-NS1 (Gene Tex® GTX133307) durante 30 minutos numa titulação 1:1000. Em seguida foram lavados duas vezes em solução tampão TBS pH 6,4 durante 3 minutos. O polímero MACH 4 kit (Biocare®, Concord, CA, EUA) foi utilizado com 20 minutos de incubação, em seguida o material foi novamente lavado em tampão TBS e o cromógeno Fast Red (Thermo Fisher Scientific®) foi adicionado e encubado durante 30 minutos. As lâminas então foram lavados em água deionizada e contra-corados em Hematoxilina de Mayer durante 5 minutos, lavados em água corrente durante 1 minuto, imersos em solução de azul de lítio a 0,01% durante 1 minuto. Por fim foram lavados novamente durante 1 minuto em água corrente e 1 minuto em água deionizada. A montagem foi feita utilizando o Aqua Mounting (Thermo Fisher Scientific®).

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados das análises foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk através do software Past v.2.17c. Após confirmada a distribuição normal dos dados, optou-se pelo teste paramétrico t student, através do software Statistica 7 v.7.0, visto que os dados foram comparados entre os grupos controle e infectado, dentro do mesmo tempo experimental.

Todos os dados quantitativos, após submetidos aos testes estatísticos, foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, sendo sinalizados com asterisco em casos de diferença estatisticamente significativa, considerado o valor de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 BIOMETRIA CORPORAL, HISTOMORFOMETRIA E ESTEREOLOGIA TESTICULAR E ANÁLISES ESPERMÁTICAS

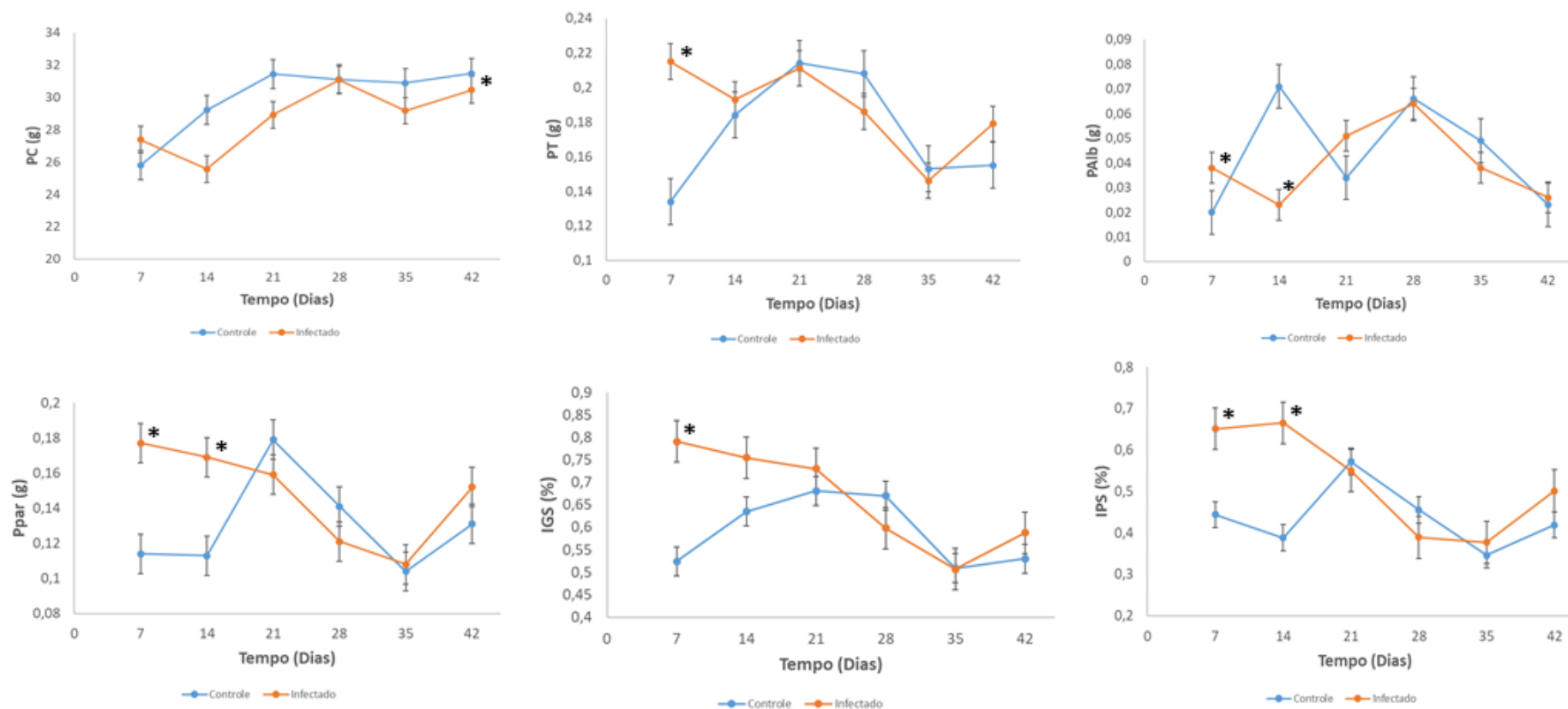
5.1.1 Biometria

O peso corporal não apresentou alterações até o 35º dia de infecção, tendo apresentado uma redução apenas após o 42º dia. Com relação ao peso gonadal, após o 7º dia foi visto aumento em 60,44%, alteração essa que não se manteve ao longo da infecção, visto que não houve diferença significativa nos demais tempos analisados (Figura 6).

O peso da túnica albugínea variou após o 7º dia, ela apresentou um aumento de 90% vindo a reduzir 67,6% no 14º dia de infecção, quando comparados ao grupo controle. Nos demais tempos experimentais seu peso se manteve sem alterações significativas. Em relação ao peso do parênquima testicular, foi observado aumento nos dois primeiros tempos experimentais, tendo aumentado 55,26% em 7 dias e 49,55% em 14 dias de infecção, quando comparados ao grupo controle (Figura 6).

O índice gonadossomático apresentou alteração apenas no 7º dia de infecção, aumentando significativamente. O índice parenquimossomático mostrou aumento no 7º dia de infecção, ocorrendo o mesmo após o 14º dia. Os demais tempos experimentais não apresentaram alterações significativas (Figura 6).

Figura 6 – Gráficos de dispersão para as análises de PC, PT, PALb, PPar, IGS e IPS.



Fonte: O autor

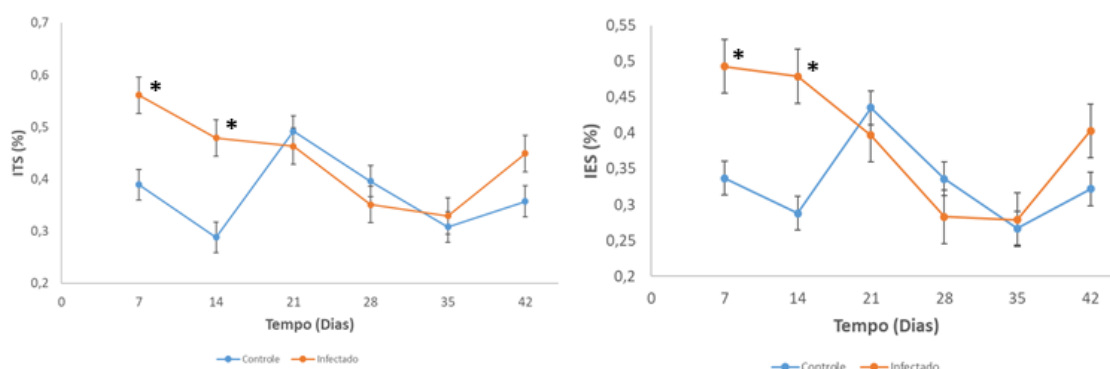
Legenda: PC(g) – Peso corporal; PT(g) – Peso testicular, PALb(g) – Peso da túnica albugínea, PPar(g) – Peso parenquimático; IGS(%) – Índice Gonadosossomático; IPS(%) – Índice Parenquiossomático. (*) – Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5.1.2 Histomorfometria e Estereologia Tubular

A proporção volumétrica mostrou redução da porcentagem de túbulos seminíferos após o 14º dia de infecção e aumento no 28º. No que se refere aos componentes dos túbulos foi visto aumento da túnica própria em 28 e em 35 dias e uma redução após 42 dias pós infecção. O epitélio seminífero reduziu 2,99% em 14 dias, 5,25% em 21 dias, 1,85% em 28 dias e 1,09% em 42 dias. Em contrapartida o lúmen aumentou nos tempos de 21, 28 e 42 dias pós infecção. A região intertubular aumentou em 7 e em 14 dias, porém reduziu em 28 dias (Figura 7).

O índice tubulossomático (ITS) e epiteliossomático (IES) apresentaram aumento após o 7º e 14º dia de infecção. O ITS após o 7º dia apresentou uma diferença de 44,21% e 68,03% após o 14º, enquanto o IES no 7º dia subiu 40,1% e 66,31% no 14º (Figura 7).

Figura 7 – Representação gráfica do Índice Tubulossomático e Epiteliossomático



Fonte: O autor.

Legenda: ITS(%) – Índice Tubulossomático; IES(%) – Índice Epiteliossomático. (*) – Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Após o 7º e 14º dia foram observados o aumento do volume dos túbulos seminíferos, justificado pelo aumento de todos os seus componentes. A túnica própria aumentou no 7º, 14º e no 28º dia. O epitélio seminífero também apresentou aumento, porém apenas no 7º e no 14º dia de infecção, se apresentando sem alterações significativas nos demais tempos. O volume do lúmen tubular também apresentou aumento no início dos tempos experimentais (7º e 14º

dia) e no 42º dia. A região intertubular aumentou no 7º e no 14º dia, porém apresentou redução no 28º (Dados suplementares – Apêndice A).

As análises morfométricas mostraram redução no diâmetro tubular no 7º dia de infecção, além da redução da altura do epitélio e do diâmetro tubular. A altura do epitélio seminífero também apresentou redução após o 35º dia. Nos demais tempos experimentais os parâmetros citados não revelaram alterações significativas, quando em comparação aos grupos controles (Tabela 1).

Após o 7º dia foi visto redução na área tubular de 10,17%, no epitélio seminífero de 7,47% e lúmen tubular de 34,84%. Nos demais tempos analisados não foram observadas alterações. A RTE foi reduzida em 2,44% em 7 dias e 5,52% após 35 dias. O comprimento total dos túbulos seminíferos e também o comprimento por grama de testículo reduziram após 7 e 14 dias pós infecção (Tabela 1).

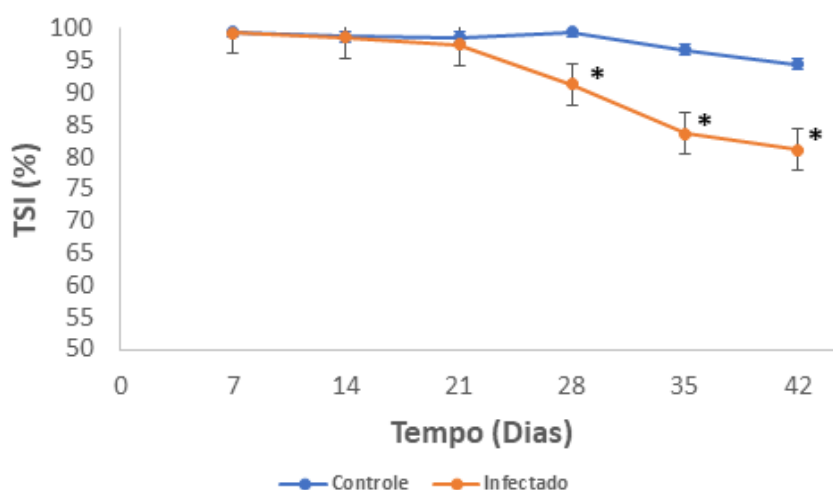
Tabela 1 – Dados biométricos, histomorfométricos e estereológicos complementares

	C7	I7	C14	I14	C21	I21	C28	I28	C35	I35	C42	I42
TS (%)	87,99±1,16	86,23±2,26*	87,68±1,13	86,14±0,93*	85,82±2,29	84,40±0,31	88,14±0,84	90,30±0,75*	88,73±3,10	87,07±0,52	89,05±0,74	89,69±0,41
ES (%)	76,39±2,18	75,83±2,35	74,26±1,51	72,10±1,31*	75,99±1,20	72,20±0,49*	73,96±1,01	72,60±0,80*	76,65±5,06	73,56±1,059	76,92±0,29	76,08±0,62*
TP (%)	2,32±0,37	2,23±0,23	2,14±0,23	2,61±0,43	2,17±0,36	2,52±0,19	1,77±0,25	4,20±0,27*	2,08±0,54	2,74±0,05*	2,98±0,28	2,52±0,19*
L (%)	9,28±1,14	8,16±0,26	11,27±0,83	11,43±0,10	7,66±1,33	9,68±0,57*	11,40±0,57	13,5±0,68*	10±2,21	10,77±0,60	9,14±0,25	11,09±0,23*
IT (%)	11,99±0,55	14,75±1,63*	12,32±1,13	13,86±0,93*	14,18±2,30	15,69±0,31	12,85±0,84	9,70±0,75*	11,27±3,10	12,95±0,52	10,95±0,74	10,40±0,41
DT (µm)	219,84±5,45	209,53±5,50*	218,27±11,48	217,50±15,54	210,49±5,45	198,30±13,96	223,96±14,40	229,30±15,30	205,28±13,03	186,32±24,58	217,31±3,71	216,14±2,33
AE (µm)	71,76±0,90	73,47±0,99*	69,74±5,19	72,61±5,14	75,66±3,44	71,73±7,81	76,27±3,23	74±5,30	68,21±1,74	65,87±10,42	77,01±0,44	82,59±7,32
DL (µm)	75,29±3,30	64,87±2,39*	78,78±8,27	72,26±11,02	59,16±4,29	54,83±5,11	71,40±20,19	81,3±7,25	73,02±4,79	50,76±4,92*	63,29±4,60	50,94±14,04
ArT x 10³ (µm²)	37,90±1,87	34,40±1,78*	37,48±3,92	37,28±5,30	34,80±1,81	30,99±4,33	39,50±5,0	41,42±5,51	33,18±4,17	27,63±7,39	37,08±1,26	36,67±0,78
ArL x 10³ (µm²)	4,45±3,87	3,30±2,4*	4,91±1,06	4,17±1,22	2,75±0,41	2,37±0,44	4,25±2,24	5,22±0,96	4,20±0,56	2,04±0,37*	3,15±0,45	2,16±0,98
ArE x 10³ (µm²)	33,50±1,60	31,17±1,74	32,56±3,48	33,11±4,46	32,04±1,86	28,61±4,44	35,24±2,89	36,20±4,79	28,98±3,88	25,59±7,51	33,92±0,80	34,51±1,34
RTE	1,13±0,008	1,106±0,009*	1,15±0,03	1,12±0,03	1,09±0,01	1,08±0,02	1,117±0,055	1,144±0,02	1,146±0,02	1,09±0,03*	1,09±0,01	1,06±0,03
CTT/t (m)	2,64±0,48	4,453±0,21*	2,63±0,46	3,96±0,52*	4,451±0,53	4,41±1,26	3,15±0,52	2,622±0,64	2,734±0,92	3,72±3,34	3,04±0,58	3,74±0,66
CTT/gt (m/g)	19,91±2,45	20,612±0,88	14,49±1,72	20,82±3,91*	20,83±1,56	20,84±5,40	15,18±2,40	13,99±2,27	20,32±7,93	22,03±13,02	20,18±4,74	20,83±2,92

Legenda: C7 – Grupo controle 7 dias; CI – Grupo infectado 7 dias; C14 – Grupo controle 14 dias; I14 – Grupo infectado 14 dias; C21 – Grupo controle 21 dias; I21 – Grupo infectado 21 dias; C28 – Grupo controle 28 dias; I28 – Grupo infectado 28 dias; C35 – Grupo controle 35 dias; I35 – Grupo infectado 35 dias; C42 – Grupo controle 42 dias; I42 – Grupo infectado 42 dias. TS(%) – Porcentagem de túbulos seminíferos; ES (%) – Porcentagem de espaço linfático; TP(%) – Porcentagem de túnica própria; L(%) – Porcentagem de células de Leydig; IT(%) – Porcentagem de intertúbulo; DT(µm) – Diâmetro tubular; AE(µm) – Área do epitélio seminífero; DL(µm) – Diâmetro do lúmen do túbulo seminífero; ArTx10³(µm³) – Área tubular; ArLx10³(µm³) – Área do lúmen; ArEx10³(µm³) – Área do epitélio; RTE – Razão do epitélio tubular; CTT/t(m) – Comprimento total do túbulo seminífero; CTT/gt(m/g) – Comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo. (*) – Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A análise histopatológica mostrou que os animais após o 7º, 14º e 21º dia de infecção não apresentaram alterações significativas no número de túbulos seminíferos íntegros. No 7º dia de infecção os animais possuíam 99,33% de túbulos sem alterações, no 14º dia 98,66% e no 21º dia 97,5%. Visto o aumento de alterações do tipo moderada após o 28º dia de infecção, o número de túbulos seminíferos normais decaiu em 19,6%. No 35º dia de infecção a redução de túbulos íntegros se manteve, sendo observado também o aumento de lesões moderadas na gônada, levando a uma redução de 19,2% dos túbulos íntegros, sendo acompanhada de 18,8% no 42º dia de infecção, quando comparado com o grupo controle (Figura 8 e 9).

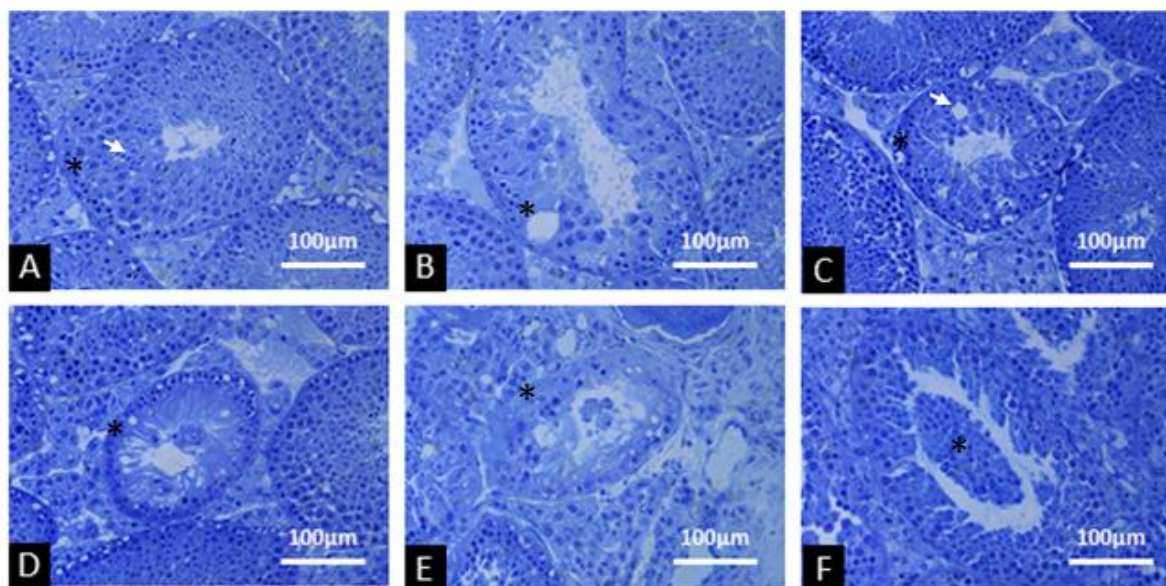
Figura 8 – Porcentagem de túbulos íntegros ao longo dos tempos de infecção



Fonte: O autor.

Legenda: TSI(%) – Túbulos seminíferos íntegros. (*) – Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 9 – Fotomicrografias de túbulos seminíferos normais e com alterações morfológicas nos grupos infectados



Fonte: O autor.

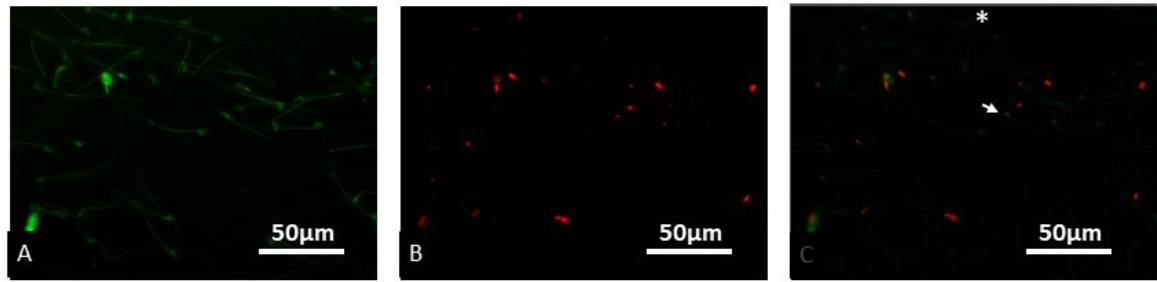
Legenda: A – Túbulos íntegros de animais controles (* indica a camada de células peritubulares e a cabeça de seta a região próxima ao ápice do epitélio seminífero); B – Túbulos com vacúolos na base do epitélio (* indica a alteração); C- Túbulos com vacúolos no ápice e na base do epitélio (* indica o vacúolo na base e a cabeça de seta a alteração no ápice); D –Túbulos com presença apenas de células basais (Indicadas por *); E– Túbulo em degeneração (Indicado por *); F – Túbulo com células de linhagem espermatogênica no lúmen (* indica a alteração).

5.1.3 Análises espermáticas

A motilidade espermática reduziu em todos os tempos experimentais. A integridade de membrana plasmática dos espermatozoides foi reduzida no 7º e no 14º dia de infecção (Tabela 2 e Figura 10).

A porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais foi mais evidenciada no 14º, 21º, 35º e no 42º dia. Em contrapartida a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente alterados aumentou no 14º dia. Dentre as alterações investigadas foram observados aumentos dos defeitos de cauda no 14º, 21º e 35º dia. Os defeitos na peça intermediária aumentaram no 14º e no 42º dia (Tabela 2).

Figura 10 – Representação da análise de integridade de membrana plasmática dos espermatozoides



Fonte: O autor.

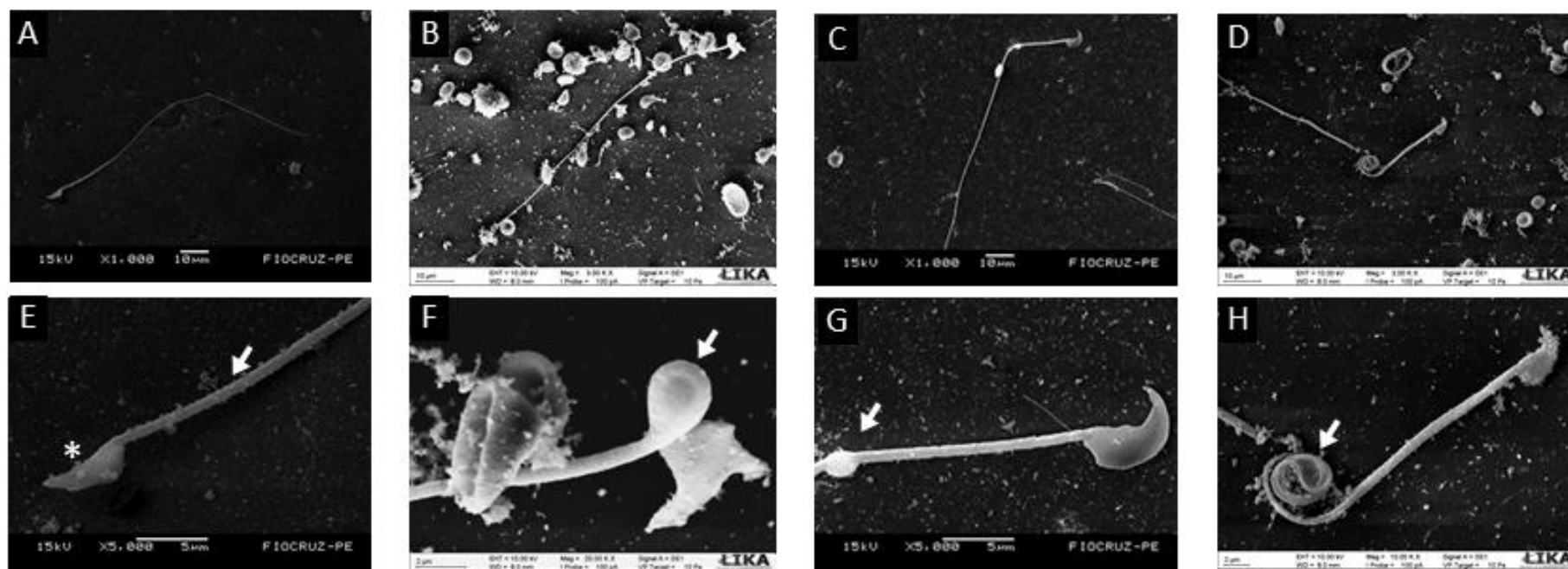
Legenda: A – Espermatozoides marcados com o CFDA; B – Espermatozoides marcados com Iodeto de Propídio; C – Espermatozoides com dupla marcação através da sobreposição das imagens, indicando em verde (*) as células viáveis e os duplamente marcados (Cabeça de seta) as semi-lesadas. As capturas das imagens foram realizadas através da objetiva de 40x, gerando um aumento de 400x.

Tabela 2 – Resultados das análises espermáticas

	C7	I7	C14	I14	C21	I21	C28	I28	C35	I35	C42	I42
Motilidade	83,75±4,14	69,41±12,40*	63,75±9,23	35± 19,50*	81,25±8,92	44,58±5,697*	74±6,83	55,16±9,10*	83,27±4,71	76,53±2,37*	34,8± 35,16	80±5,27*
IM	39,50±2,89	32±3,56*	40±9,20	18,50±14,62*	47±12,52	33,75±10,50	21,25± 4,27	14,75±9,25	15,5±7,94	7±4,69	26,5± 14,25	12,5±4,36
Normais (%)	80,12±5,83	81,75±5,29	91,37±1,08	81,99±6,19*	92,25±2,58	85,89±8,61*	90,33± 2,218	83,75± 3,631	73,87± 11,36	59,5±5,03*	85,62± 3,575	76±4,38*
Patológicos (%)	19,87±5,83	18,25±5,25	8,62±1,08	18,87±5,94*	7,74±2,58	14,1±6,14	9,62±1,38	16,25± 3,361*	26,12± 11,36	40,5±5,03	14,37± 3,575	24±3,295*
DC	13,25±5,92	14,75±5,25	7,25±1,41	13,62±4,81*	6,37±1,75	13,67±5,98*	9,25±1,25	14,87± 3,54*	24,13± 11,77	36±7,05*	10±4,387	13,62± 4,292
GC	2,37±2,96	1,25±0,43	0,37±0,64	0,25±0,25	0,62±0,649	0,375±0,414	0,25±0,25	0,25±0,25	0,25±0,433	2,75±1,08	1,625± 1,138	6±5,83*
DPI	4,25±188	2,25±1,03	1±0	5±2,54*	0,75±0,55	0±0*	0,125± 0,216	1,125± 1,430	1,75±1,63	1,75±1,34	2,75±0,75	4,375± 1,19*

Legenda: C7 – Grupo controle 7 dias; I7 – Grupo infectado 7 dias; C14 – Grupo controle 14 dias; I14 – Grupo infectado 14 dias; C21 – Grupo controle 21 dias, I21 – Grupo infectado 21 dias; C28 – Grupo controle 28 dias; I28 – Grupo infectado 28 dias; C35 – Grupo controle 35 dias, I35 – Grupo Infectado 35 dias; C42 – Grupo controle 42 dias, I42 – Grupo infectado 42 dias. IM – Integridade de membrana plasmática; DC – Espermatozoides com defeito de cauda; GC – Espermatozoides com gota citoplasmática; DPI – Espermatozoides com defeito na peça intermediária. (*) – Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 11 – Representação das alterações morfológicas encontradas nos espermatozoides sob análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)



Fonte: O autor.

Legenda: A e E – Espermatozoides morfologicamente íntegros (* indica a cabeça e a seta a cauda); B e F – Espermatozoides com defeito de peça intermediária (Seta indica a região do defeito); C e G – Espermatozoides com a presença de gota citoplasmática na cauda (Seta indica a região do defeito); D e H – Espermatozoides com defeito de cauda (Seta indica a região do defeito). (*) – Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5.1.4 Histomorfometria e Estereologia Intertubular

5.1.4.1 Região Intertubular

A análise de proporção volumétrica das células de Leydig mostrou redução, após o 28º dia em seu citoplasma, já após o 35º e 42º dia observou-se aumento na porcentagem de área do núcleo destas células, o que fez com que a proporção geral de células de Leydig caísse neste último grupo.

A área ocupada pelo espaço linfático aumentou no 14º dia de infecção e reduziu no 28º dia. O tecido conjuntivo também apresentou redução neste último tempo, porém se manteve estável nos demais tempos experimentais. A frequência de macrófagos apresentou aumento de 37,67% no 21º dia pós infecção. A frequência de vasos sanguíneos não foi alterada (Figura 3).

O volume dos núcleos e de células de Leydig aumentaram no 7º dia de infecção, não apresentando alterações nos demais tempos. O volume do seu citoplasma não alterou em nenhum dos tempos experimentais. O espaço linfático aumentou após o 14º dia, porém foi reduzido no 28º pós infecção. O volume de macrófagos aumentou apenas no 14º dia. Os vasos sanguíneos não apresentaram alterações significativas. O índice intertubulossomático apresentou aumento no 14º e reduziu no 28º dia (Figura 12).

Tabela 3 – Resultado do percentual dos componentes testiculares

	C7	I7	C14	I14	C21	I21	C28	I28	C35	I35	C42	I42
VS (%)	0,89±0,3 0	1,15± 0,53	0,73±0,5 3	1,03±0,6 7	1,84±0,5 8	1,91±0,5 0	1,23±0,1 7	0,92±0,2 6	0,64±0,4 2	0,76±0,4 2	1,24±0,1 3	1,06±0,3 4
EL (%)	2,36±0,6 8	2,35±1,0 2	0,97±0,3 5	1,67±0,5 8*	1,02±0,1 2	1,21±0,4 5	1,41±0,4 5	0,79±0,2 8*	0,63±0,5 1	1,49±0,8 6	1,04±0,0 02	1,36±0,7 0
NCL (%)	0,96±0,2 7	1,19± 0,33	1,21± 0,25	1,05±0,2 4	1,01±0,1 7	0,98±0,1 9	0,64±0,1 1	0,57±0,0 5	0,45±0,3 4	0,87±0,1 9*	0,47±0,0 2	0,58±0,1 0*
CCL (%)	4,96±0,9 2	5,92±1,7 7	5,63±0,6 4	5,61±0,5 8	5,98±1,6 0	5,96±1,0 0	4,30±0,6 2	3,41±0,3 8*	2,56±1,9 2	4,26±0,6 7	3,42±0,2 8	3,22±0,0 7
CL (%)	5,931±1, 12	7,11±2,0 6	6,84±0,8 6	6,66±0,7 5	6,99±1,7 2	6,94±1,1 2	4,94±0,7 2	3,98±0,4 0*	3,02±2,2 4	5,13±0,7 5	3,89±0,2 6	3,81±0,1 6
TC (%)	2,54±0,6 3	3,03±0,4 4	2,96±0,4 3	4,12±0,6 9	3,96±1,0 5	5,12± 0,92	5,08±0,8 5	3,86±0,6 5*	2,88±2,0 8	5,15±1,1 1	4,00±0,2 1	3,88±0,7 5
MAC (%)	0,25±0,1 2	0,10±0,0 8	0,13±0,1 0	0,37±0,1 2*	0,36±0,1 2	0,49±0,0 7*	0,19±0,0 4	0,15±0,0 6	0,22±0,1 9	0,397±0, 18	0,17±0,0 4	0,19±0,0 4
IIS (%)	0,14±0,0 2	0,18±0,0 4	0,13±0,0 2	0,19±0,0 2*	0,17±0,0 2	0,20±0,0 2	0,06±0,0 1	0,04±0,0 1*	0,03±0,0 2	0,05±0,0 3	0,04±0,0 2	0,06±0,0 2

Legenda: C7 – Grupo controle 7 dias; CI – Grupo infectado 7 dias; C14 – Grupo controle 14 dias; I14 – Grupo infectado 14 dias; C21 – Grupo controle 21 dias, I21 – Grupo infectado 21 dias; C28 – Grupo controle 28 dias; I28 – Grupo infectado 28 dias; C35 – Grupo controle 35 dias, I35 – Grupo Infectado 35 dias; C42 – Grupo controle 42 dias, I42 – Grupo infectado 42 dias. VS(%) – Porcentagem de vasos sanguíneos; EL(%) – Porcentagem de espaço linfático; NCL(%) – Porcentagem de núcleo de células de Leydig; CCL(%) – Porcentagem de citoplasma de células de Leydig; CL(%) – Porcentagem de células de Leydig; TC(%) – Porcentagem de tecido conjuntivo; MAC(%) – Porcentagem de macrófagos; IIS(%) – Índice Intertubulossomático. (*) – Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

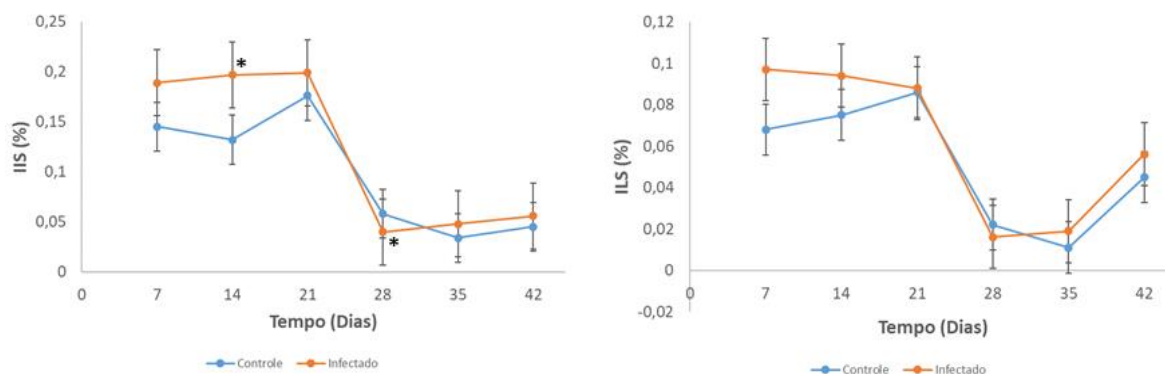
5.1.4.2 Células de Leydig

A morfometria do núcleo das células de Leydig mostrou que houve redução de 6,43% após o 21º dia de infecção e de 4,77% no 42º. Nos demais tempos experimentais não foram vistas alterações no diâmetro nuclear, quando comparados com os grupos controles (Figura 4).

O volume nuclear também se apresentou alterado no 21º dia, com redução de 20,3%, e no 42º dia, com redução de 14,41%. O volume do seu citoplasma reduziu apenas neste último tempo, contudo as alterações nucleares e citoplasmáticas não alteraram o volume total das células. Em contrapartida, o volume total de células no testículo apresentou aumento de 44,44% no 7º dia de infecção, que não refletiu no volume total das células por grama do órgão (Tabela 4).

O número total de células de Leydig no testículo aumentou no tempo de 7 dias de infecção, não mostrando alterações nos demais tempos. O número de células por grama de testículo apresentou alteração apenas após o 42º dia. O índice Leydigossomático (ILS) não apresentou alteração em nenhum dos tempos experimentais estudados (Figura 12).

Figura 12 – Gráficos de dispersão para as análises de IIS e ILS.



Fonte: O autor.

Legenda: IIS(%) – Índice Intertubulossomático; ILS(%) – Índice Leydigossomático. (*) – Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 4 – Resultado das análises de células de Leydig

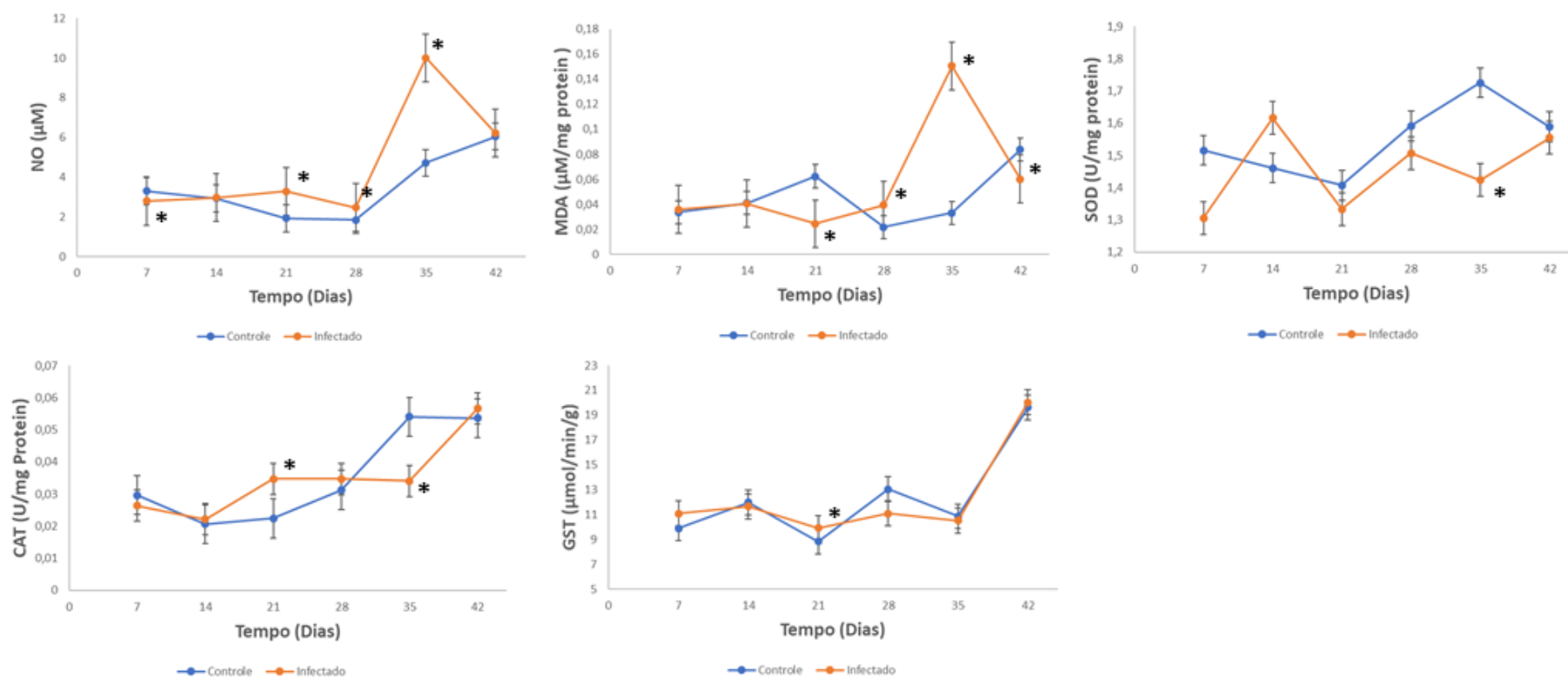
	C7	I7	C14	I14	C21	I21	C28	I28	C35	I35	C42	I42
DNL	7,35± 0,70	7,881±	7,881±	7,654±	8,447±	7,939±	8,751±	8,641±	8,42±0,338	8,386±	8,123±	7,75±0,32*
(µm)		0,347	0,251	0,154	0,324	0,346*	0,307	0,288		0,429	0,054	
VNL	226,24±	257,41±	246,74±	234,89±	316,54±	263,11±	351,85±	338,58±	301,44±	310,66±	280,57±	245,23±
(µm³)	25,94	34,08	33,99	13,89	36,64	33,21*	37,39	32,51	46,72	47,3	5,638	31,58*
VCL	1267,66±	1295,73±	1231,95±	1295,32±	1880,40±	1620,43±	2378,81±	2052,89±	1911,6±	1573,91±	2060,17±	1390,34±
(µm³)	351,98	286,61	261,97	241,39	483,22	399,64	376,71	409,18	541,75	444,76	277,53	352,37*
VL	1503,33±	1553,15±	1488,98±	1530,22±	2196,95±	1883,54±	2730,66±	2391,48±	2118,88±	1884,58±	2340,74±	1635,57±
(µm³)	368,86	311,49	286,67	236,99	509,20	419,43	412,44	439,3	600,12	465,90	283,17	375,94*
VL/t x 10⁹	0,02± 0,003	0,026±	0,021±	0,024±	0,027±	0,025±	0,007±	0,004±	0,003±	0,005±	0,004±	0,006±
(µm³)		0,006*	0,004	0,003	0,006	0,003	0,001	0,001	0,002	0,003	0,001	0,002
VL/gt x 10⁹	0,06± 0,01	0,065±	0,054±	0,062±	0,064±	0,06± 0,011	0,033±	0,025±	0,018±	0,034±	0,028±	0,032±
(µm³)		0,019	0,007	0,005	0,016		0,007	0,005	0,014	0,015	0,002	0,006
NL/t x 10⁶	12,87± 9,28	17,06±	15,57±3,73	16,00± 3,04	12,54±1,80	13,82± 3,21	2,63±0,78	2,01±0,53	2,03±0,17	3,17±2,30	2,39±1,09	4,03±1,81
		2,79*										
NL/gt x 10⁶	42,02±17,89	42,17±7,90	40,41±10,90	41,68±7,43	29,36±3,03	33,46±9,37	12,69±0,36	10,76±1,82	10,89±1,24	20,20±1,84	12,74±2,5	20,39±6,62*
ILS (%)	0,07±0,01	0,09±0,031	0,07±0,014	0,094±0,013	0,09±0,01	0,09±0,02	0,02±0,005	0,02±0,004	0,01±0,008	0,02±0,01	0,015±0,006	0,02±0,006

Legenda: C7 – Grupo controle 7 dias; I7 – Grupo infectado 7 dias; C14 – Grupo controle 14 dias; I14 – Grupo infectado 14 dias; C21 – Grupo controle 21 dias; I21 – Grupo infectado 21 dias; C28 – Grupo controle 28 dias; I28 – Grupo infectado 28 dias; C35 – Grupo controle 35 dias; I35 – Grupo infectado 35 dias; C42 – Grupo controle 42 dias; I42 – Grupo infectado 42 dias. DNL(µm) – Diâmetro do núcleo de células de Leydig; VNL(µm³) – Volume do núcleo de células de Leydig; VCL(µm³) – Volume do citoplasma de células de Leydig; VL(µm³) – Volume de células de Leydig; VL/tx10⁹(µm³) – Volume de células de Leydig no testículo; VL/gtx10⁹(µm³) – Volume de células de Leydig por grama de testículo; NL/tx10⁶ – Número de células de Leydig por testículo; NL/gtx10⁶ – Número de células de Leydig por grama de testículo; ILS(%) – Índice Leydigossomático. (*) – Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5.2 ESTRESSE OXIDATIVO

A dosagem da enzima superóxido dismutase (SOD) mostrou aumento na concentração testicular no 35º dia de infecção. A catalase (CAT) reduziu no 21º dia, contudo, apresentou aumento no 35º. A glutathione S-transferase (GST) aumentou no 21º dia, mantendo-se sem alterações significativas nos demais tempos. O malondialdeído (MDA) apresentou redução no 21º e no 42º dia e aumento no 28º e no 35º dia. O óxido nítrico reduziu no 7º, contudo aumentou a partir do 21º dia, apresentando diferença significativa do 21º ao 42º dias pós infecção (Figura 13).

Figura 13 – Gráficos representando as alterações nos níveis dos marcadores de estresse oxidativo e enzimas envolvidas



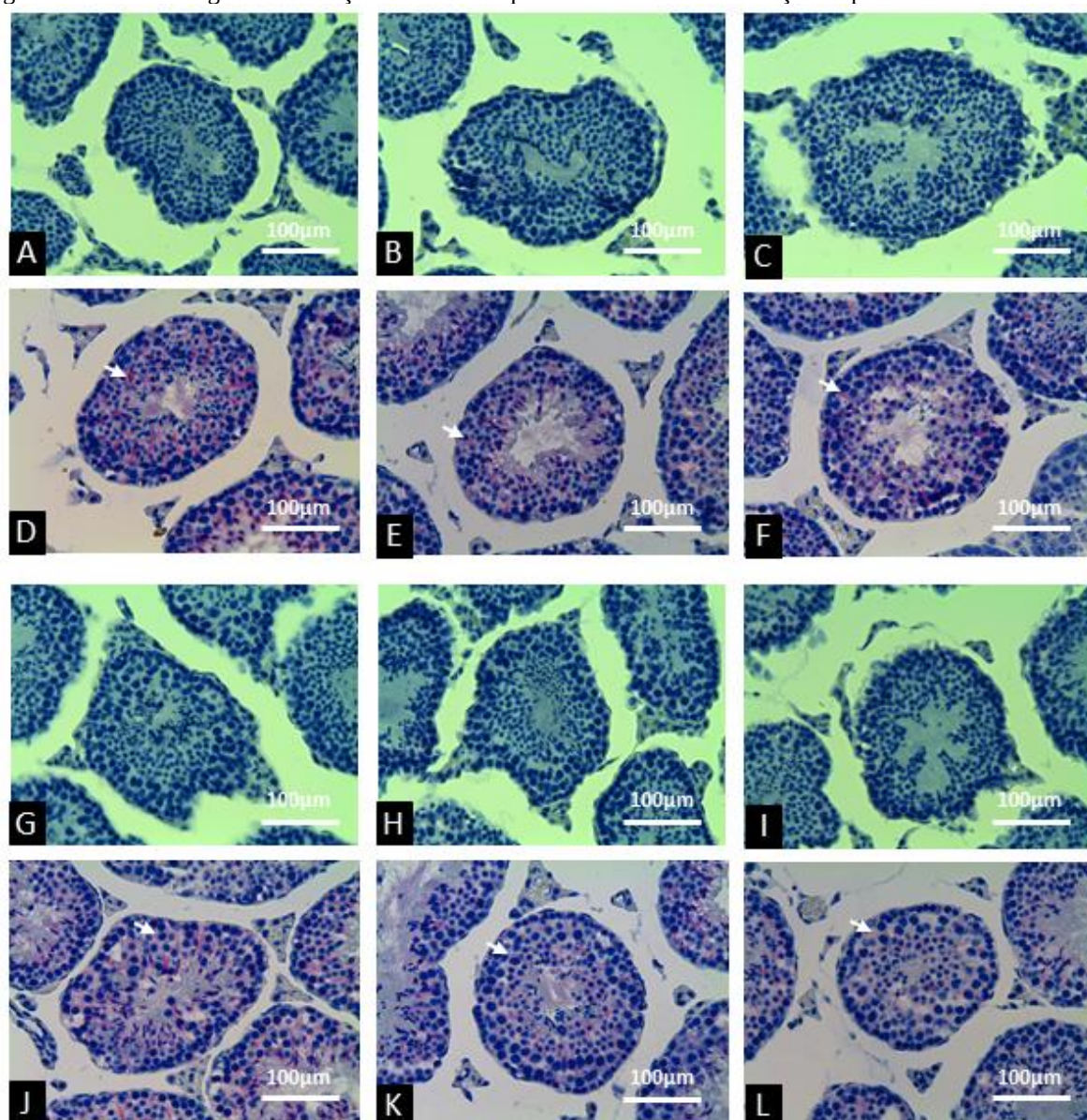
Fonte: O autor.

Legenda: NO – Óxido Nítrico; MDA – Malondialdeído; SOD – Enzima Superóxido Dismutase; CAT – Enzima Catalase; GST – Enzima Glutathione S-transferase. (*) indica diferença estatística entre os grupos controle e infectado dentro do respectivo tempo experimental. (*) – Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5.3 REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

A reação de imunohistoquímica confirmou a expressão da proteína NS1 no ambiente testicular nos diversos tempos estudados. As células que compõem o epitélio seminífero foram as que apresentaram uma marcação mais pronunciada, diferentemente das células da região intertubular (Figura 14).

Figura 14 – Fotomicrografias da reação imuno-histoquímica mostrando a marcação da proteína NS1.



Fonte: O autor.

Legenda: A – Controle 7 dias; B – Controle 14 dias; C – Controle 21 dias; D – Infectado 7 dias; E – Infectado 14 dias; F – Infectado 21 dias; G – Controle 28 dias; H – Controle 35 dias; I – Controle 42 dias; J – Infectado 28 dias; K – Infectado 35 dias; L – Infectado 42 dias. A coloração vermelha (Cromógeno Fast Red, Thermo Fisher®) indica o local de marcação da proteína NS1 (Indicado pelas setas).

6 DISCUSSÃO

O peso corporal dos animais mostrou tendência de redução ao longo do tempo, contudo esta mudança se apresentou significativa no 42º dia de infecção. Segundo Chan e colaboradores (2016), com protocolo de infecção e imunossupressão semelhante ao utilizado neste trabalho, foi observado também alteração do peso corporal. O estudo citado, utilizou camundongos adultos de linhagem balb/C imunodeprimidos com dexametasona e infectados com o vírus Zika, mostrando que o peso corporal decaiu ao longo dos dias de infecção estando este agravo relacionado com a infecção pelo vírus Zika.

Os nossos achados, em relação as alterações de natureza biométricas no testículo, evidenciam danos que refletem alterações em nível celular. Conforme Amann (1970), Amann e Schanbacher (1983) e França e Russel (1998), as alterações biométricas destas estruturas são importantes parâmetros para avaliação do estado funcional do órgão e para estimar a eficiência de algumas atividades, como por exemplo, a produção espermática.

Segundo Setchell e Breed (2006) o testículo possui uma parcela importante do peso corporal do indivíduo, podendo essas medidas serem relacionadas, gerando o chamado Índice Gonadosomático (IGS). Esse índice, juntamente com o IPS alteraram no 7º e 14º dia, sendo a dexametasona o causador desta alteração, como visto por Kaur, Sharma e Gupta (1989), visto que os animais foram submetidos a droga até o 9º dia pós infecção.

A análise de proporção volumétrica mostrou que houve redução da proporção de epitélio seminífero, componente fundamental dos túbulos seminíferos, na maior parte dos tempos analisados. Neste epitélio, conforme publicado por Russel e colaboradores (1990), é onde se encontram as células de linhagem germinativa, responsáveis pela formação do gameta, e as células de Sertoli, que dão suporte a elas. Isso faz com que qualquer alteração tubular possa ter um reflexo na produção espermática e em alterações morfofuncionais no espermatozoide. O aumento do volume da túnica própria foi observado no 7º, 14º e no 28º dia, divergindo das alterações na proporção volumétrica, onde observou-se aumento no 28º e no 35º dia e uma redução após o 42º. A relação da túnica própria com o processo espermatogênico ainda é pouco conhecida, contudo, sabe-se que o espessamento da túnica pode estar associado ao aumento da malha proteica da lâmina basal. Isso ocorre devido a deposição de fibras colágeno estimuladas pela decorina, uma proteoglicana relacionada com a

síntese de fibrinogênio em testículos inférteis (BHIDE et al., 2005; ORGEL et al., 2009; ADAM et al., 2011).

Nossos achados, em relação a divergência da proporção volumétrica e de volume dos tubos seminíferos, podem ser justificados pela mudança no peso líquido do testículo, que influencia o volume dos seus componentes, podendo não alterar a frequência em que esses aparecem no órgão. Segundo os trabalhos de França e Russel (1998) e Godinho (1999), a relação entre os compartimentos tubular, onde há a produção espermática, e o intertubular, onde há a síntese de hormônios esteroides, é espécie-específico. Diferenciando dos nossos achados visto que, dentro da mesma espécie e linhagem animal, a proporção e o volume de lúmen tubular e da túnica própria aumentaram conjuntamente.

Na análise das patologias tubulares foi visto que as alterações coincidem com o período em que houve o aumento do volume da túnica própria, apresentando-se de forma significativa no ambiente testicular. Corroborando com o observado por Russel (1980), em sua análise geral dos testículos, onde observou que o surgimento das patologias pode estar relacionado com o rompimento da barreira de células de Sertoli, um ambiente imunoprivilegiado que tem como objetivo proteger o epitélio seminífero dos agentes deletérios presentes no sangue e/ou no intertúbulo.

Na avaliação do fluido espermático, foi observado que houve redução no quantitativo de espermatozoides morfolologicamente normais nos animais infectados. Estas alterações estruturais possivelmente refletiram na motilidade das células, que foi reduzida de forma significativa em todos os tempos experimentais, como observado por Kempinas e colaboradores (1998) e por França e colaboradores (2005). Em nossas avaliações morfológicas nos espermatozoides observamos alterações na cabeça e na cauda sugerindo que os animais possuem problemas na fertilidade durante este período, corroborando com os achados de De Jonge e Barratt (2006), quando observou que a redução na motilidade e o aumento de alterações na morfologia espermática comprometem a fecundação. Além dessas alterações observou-se uma redução do número de espermatozoides com membrana íntegra nos tempos experimentais inicial, comprometendo a viabilidade destas células.

Através da marcação imunohistoquímica constatamos a presença de partículas virais na região tubular, sendo de acordo com os achados de Silva (2018), quando observou a presença de vírus nos túbulos seminíferos. Em um trabalho realizado por Govero e colaboradores (2016) viu-se que o vírus Zika possui a capacidade de penetrar no epitélio seminífero, infectando células de Sertoli, podendo causar a disfunção destas células, além de infectar

espermatozoides, corroborando com nossos achados. Segundo Creasy (2001) as células de Sertoli são muito resistentes a morte celular, capazes de se manterem aderidas à túnica própria do túbulo em alterações severas, como em caso de esfoliação ou descamação do epitélio seminífero. Estando estes resultados em consonância com nossos achados na análise de patologia tubular, quando observamos estas mesmas alterações, além da presença de espermatozoides morfollogicamente viáveis.

A região intertubular também apresentou aumento da sua proporção e no seu volume. Essas alterações são reflexos nas mudanças morfológicas de seus componentes, que também alteraram nas análises de volume e de proporção volumétrica. Como observado por nós, em relação a variação da proporção dos macrófagos, quando no início do experimento não houve diferença significativa, corroborando com os achados de Rosa e colaboradores (2003) e de Mallard e colaboradores (2009), onde mostraram que a dexametasona, fármaco anti-inflamatório esteroide, atua na redução da produção e ação de citocinas e de interferon- γ . No decorrer do experimento observamos a hipertrofia e posteriormente a proliferação dos macrófagos analisados, como observado por Bushan e colaboradores (2009), onde mostra que os macrófagos atuam na linha de frente contra agentes infecciosos no ambiente testicular.

O espaço linfático mostrou aumento nas análises de volume e de proporção volumétrica que acompanhou o aumento dos macrófagos e, posteriormente reduziu pela estabilização destas células, como também observado por Fawcett (1973). Ele mostrou que o espaço linfático é um importante componente testicular envolvido na drenagem de agentes lesivos do testículo, alterando seu volume quando há ação de agentes infecciosos.

As alterações volumétricas iniciais relacionadas as células de Leydig, corroboram com os achados de Uraki e colaboradores (2017), que mostraram que danos iniciais sobre estas células reduzem seu volume e, conseqüentemente, sua atividade. Posteriormente houve o aumento do número de células em todo o testículo, indicando um aumento da atividade deste compartimento na região intertubular.

Em relação a nossa avaliação de estresse oxidativo, observamos uma variação relacionada aos marcadores e o tempo dos experimentos. Estes achados corroboraram com os encontrados por Cummins e colaboradores (1994) e por Jenebian e colaboradores (2016), que mostraram que vírus podem infectar o sistema reprodutor masculino aumentando as EROs e, conseqüentemente, os níveis de estresse.

A redução inicial de ON ocorreu devido a ação da dexametasona conforme visto por Walker, Pfeilschifter & Kunz (1997). As alterações deste marcador a partir do 21º dia corroboram com os achados de Li e colaboradores (2017) e Souza e colaboradores (2018), que também observaram um aumento dos níveis de EROs em modelos biológicos infectados com flavivirus. As alterações da CAT ocorreram em consonância com a SOD que, como visto por Barbosa e colaboradores (2010), atuam de forma complementar participando da primeira linha de defesa contra alterações. Os achados em relação ao MDA complementam as alterações da GST que, segundo a literatura (HABIG et al., 1974; HAYES et al., 2005; BARREIROS et al., 2006; AITKEN & ROMAN, 2008), auxilia na manutenção dos níveis deste marcador do estresse. Este mesmo marcador reduziu após o 42º dia, indicando o fim do estresse oxidativo.

7 CONCLUSÃO

A infecção pelo vírus Zika promove o aumento das EROs, levando a um quadro de estresse oxidativo após o 28º dia de infecção, promovendo diversas alterações no sistema reprodutor masculino. A permanência do vírus nas células de Sertoli resulta no desenvolvimento de patologias tubulares progressivas, que culmina em danos nos espermatozoides formados. Em outra esfera, o vírus atua em longo prazo sobre as células de Leydig, o que pode modificar a concentração sérica de testosterona, alterando a espermatogênese e também a fertilidade destes indivíduos.

REFERÊNCIAS

- ADAM, M. et al. **Mast cell tryptase stimulates production of decorin by human testicular peritubular cells: Possible role of decorin in male infertility by interfering with growth factor signaling.** Human reproduction. 36: 2613-2625, 2011.
- AEBI, H. **Oxygen radicals in biological systems.** Methods Enzymology. 105: 121-126, 1984.
- AITKEN, R.J.; ROMAN, S.D. **Antioxidant systems and oxidative stress in the testes.** Oxi Med Cell Longev. 1: 15-24, 2008.
- ALIOTA, M.T. et al. **Characterization of lethal Zika virus infection in AG129 mice.** Neglected tropical diseases. 10(5), 2016.
- AMANN, R. **The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output.** Fertil Steril. 21: 662-672, 1970.
- AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. **Physiology of male reproduction.** Journal of animal Science. 57: 380-403, 1983.
- AMES, B.N.; PROFET, M.; GOLD, L.S. **Nature's chemicals and synthetic chemicals: comparative toxicology.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Washington, v. 87, p. 7782-7786, 1990.
- ARMSTRONG, N.; HOU, W.; TANG, Q. **Biological and historical overview of Zika virus.** World Journal of Virology. 6(1); 1, 2017.
- ASHIZAWA, K. et al. **Protein phosphatase-type 2B is involved in the regulation of the acrosome reaction but not in the temperature-dependent flagellar movement of fowl spermatozoa.** Reproduction, v. 128, n. 6, p. 783-787, 2004.
- ATIF, M. et al. **Zika virus disease: a current review of the literature.** Rev Infection. 44(6); 695-705, 2016.
- BARBOSA, K.B.F. et al. **Estresse oxidativo: Conceitos, implicações e fatores modulatórios.** Revista Nutrição. 23(4): 629-643, 2010.
- BARDIN, C. W. **The anabolic action of testosterone.** The New England journal of medicine, n. 1, v. 335, p. 52-53, 1996.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Normal bovine spermatogenesis and sperm maturation. In: . Abnormal morphology of bovine spermatozoa.** 1ª edição, Ames: Iowa State University Press. Cap. 3, p. 19-88, 1989.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. **Estresse oxidativo Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química nova. 29(1): 113-123, 2006.

BAUD, D. et al. **An update on Zika virus infection.** The Lancet. 6736(17), 2017.

BERNDTSON, W.E. **Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review.** J. Anim Sci, n.5,v.44, p.818-883, 1977.

BHIDE, V.M. et al. **Collagen phagocytosis by fibroblasts is regulated by decorin.** Journal biological chemistry. 280: 3103-23113, 2005.

BLUE, J.G.; LOMBARDO, J.A. **Steroids and steroid-like compounds.** Clinics in Sports Medicine, n. 3, v. 18, p. 667-689, 1999.

BOEKELHEIDE, K. **Sertoli cell biology.** San Diego, 345-382, 2005.

BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo, patologia.** 9º edição. Ed. Guanabara Koogan, p. 1524, 2016

BROGUEIRA, P.; MIRANDA, A. C. **Vírus Zika : Emergência de um Velho Conhecido Zika Virus.** Revista de Sociedade Portuguesa de Medicina Interna, 146–153, 2017.

BUSHAN, S. et al. **Microorganisms implications and host-pathogen interaction.** Journal Reprod Immunol. 83: 164-167, 2009.

CAPEL, B. **The battle of sexes.** Merch. Dev, n.1, v. 92, p. 89 -103, 2000.

CARREAU, S. et al. **Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male.** J. Androl, n. 4, v. 22, p. 211-223, 1999.

CASTRO, A.C.S.; BERNDTSON, W.E.; CARDOSO, F.M. **Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits.** Brazilian Journal of Medical and biological Research. 35: 493-498, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Zika cases in the United States. Centers for disease control and prevention, Atlanta, GA.
<<https://www.cdc.gov/Zika/reporting/case-counts.html>> Acesso em: 31 out 2018.

CHAD, S. et al. **Comparative histopathologic lesions of the male reproductive tract during acute infection of Zika virus in AG129 and IFNAR^{-/-} Mice.** The American journal of pathology. 188(4): 904-915, 2018.

CHAN, J.F. et al. **Zika virus infection in dexamethasone-immunosuppressed mice demonstrating disseminated infection with multi-organ involvement including orchitis effectively by recombinant type I interferons.** EBioMedicine. 14: 112-122, 2016.

CHAN, J. F. W. et al. **Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease.** Journal of Infection. 72 (5); 507-524, 2016.

GHANG, C.; ORTIZ, K.; ANSARI, A.; GERSHWIN, M. E. **The Zika outbreak of the 21s century.** Journal of Autoimmunity. 68, 1-13, 2016.

CHENG, C. Y.; MRUK, D. D. **Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development.** Physiol. Rev n.4, v. 82, p. 825-74. 2002

CHIARINI-GARCIA, H.; RUSSELL, L.D. **High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia.** Biol. Reprod. 4(65): 1170-78, 2001.

COSENTINO, M.J.; COCKETT, A.T.K. **Structure and function of the epididims.** Urological Research. 14 (5): 229-240, 1986.

CREASY, D.M. **Pathogenesis of male reproductive toxicity.** Toxicologic Pathology. 30(4): 507-520, 2001.

CREASY, D.M. **Evaluation of testicular toxicology: A synopsis and discussion of the recommendations proposed by The Society of Toxicology Pathology. Birth Defects Research part B. Development and Reproductive Toxicology.** 68(5): 408-415, 2003.

CUMMINS, J.M.; JEQUIER, A.M.; KANI, R. **Molecular biology of human male infertility: Links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress?** Molecular reproduction and development. 362: 345-362, 1994.

DECKARD, D.T. et al. **Male-to-male sexual transmission of Zika virus – Texas, January 2016.** Morbidity and mortality weekly report. 65(14): 372-374, 2016.

DESCLAUX, A. et al. **Probable sexually transmitted Zika virus infection in a pregnant woman.** N Engl J Med. 378: 1458-1460, 2018

DIAS, F.C.R.D. et al. **Hydroalcoholic extract of Pfaffia glomerata alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes.** Journal of ethnopharmacology. 233: 179-189, 2019.

DIXON, D.; DAVIES, B.G.; EDWARDS, R. **Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants – Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in Arabidopsis thaliana.** The Journal of Biological Chemistry. Baltimore, v. 277, n. 34, p. 30859-30869, 2002.

DOHERTY, M.L. et al. **Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle.** American journal of veterinary research. 56: 1300-1306, 1995.

DOMENICONI, R.F. et al. **Is the epididymis a series of organs placed side by side? Biology of reproduction** 95(1): 10, 1-8, 2016.

DORST, V.J. **Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug.** Monotsh ver med. 29: 650-652, 1974.

D'ORTENZIO, E. et al. **Evidence of sexual transmission of Zika virus.** J Med. 374(22): 2195-8, 2016.

DROGE, W. **Free radicals and the physiological control of cell function.** Physiological Reviewls. 82: 47-95, 2002.

DUONG, V.; DUSSART, P.; BUCHY, P. **Zika virus in Asia.** International Journal of Infectious Diseases. 54: 121–128, 2017.

FALLAHI, S. et al. **Would Phoenix Dactyflera Pollen (Palm seed) be considered as a treatment agente against males' infertility? A sistematic review.** Electron physician. 7(8): 1590-1596, 2015.

FAWCETT, D.W.; NEAVES, W.B.; FLORES, M.N. **Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis.** Biol Reprod. 9(5): 500-32, 1973.

FERREIRA, U. M. G., et al. **Esteróides anabólicos androgênicos.** Revista Brasileira em Promoção da Saúde. 20(4): 267-275, 2007.

FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. **Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the processo of fertilization.** Biochimica et Biophysica Acta.1469(3): 197 – 235, 2000.

FOY, B.D. et al. **Probable non-vector-born transmission of Zika vírus, Colorado, USA.** Emerg Infect Dis. 17(5): 880-2, 2011.

FRANÇA, L.R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau.** Belo Horizonte: UFMG, 1991, 180p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1991.

FRANÇA, L.R. et al. **Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat.** Biol Reprod. 59: 1371– 1377, 1998.

FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F. **Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs.** Theriogenology. 63(2): 300-318, 2005.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. **The testis of domestic animals.** In: REGADERA, J., MARTINEZ GARCIA (Eds.). Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Livingstone, Cap. 16, p.197-219. 1998.

FROVA, C. **The plant glutathione transferase gene Family: genomic structure, functions, expressions and Evolution.** Physiol. Plantarum. 119(4): 469-479, 2003.

- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. **Espermatozoides e plasma seminal**. In: HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. (Ed). *Reproduction Animal*. 7ª edição. Barueri: Manole. Cap. 7, p. 97-110, 2004.
- GATTI, J.L. et al. **Post-testicular sperm environment and fertility**. *Animal Reproduction Science*, 82: 321-339, 2004
- GODIC, A. et al. **The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment**. *Oxidative Medicine and celular longevity*. 1 - 6, 2014.
- GODINHO, C.L. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros**. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 80p, 1999.
- GOVERO, J. et al. **Zika virus infectin damages the testes in mice**. *Nature*. 540:438-442, 2016.
- GULLAND, A. **Zika virus is a global public health emergency, declares who**. *BMJ*. 352, 2016.
- HABIG, W.H. PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. **Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation**. *The Journal of Biological Chemistry*. 249(22): 7130-7139, 1974.
- HAMER, D.H., et al. **Epidemiology, prevention and potential future treatments of sexually transmitted Zika virus infection**. *Current Infectious Disease Reports*, 19: 16 (4), 2017.
- HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. **Glutathione transferases**. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 51-88, 2005.
- HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals**. In: Wiley & SONS, J.; HOBOKEN, N.J. *Functional Metabolism: Regulation and Adaption*. Ed. K.B. Storey, p.640, 2004.
- HERMO, L., ROBAIRE, B. **Epididymal cell types and their functions**. *Kluwer Academic*, 1 (5): 81-102, 2002.
- HESS, R.A.; De FRANCA, L.R. **Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium**. In: *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Springer New York, 2009. p. 1-15. HESS, D.R. *Nebulizers: Principles and Performance*. *Respir.Care*, n.45 v, 6.p.609–622, 2000.
- HUITS, R. et al. **Kinetics of Zika virus persistence in semen**. *Bull. World Health Organ*. 6: 1-12, 2016.

INTERNATIONAL COMITEE ON TAXONOMY OF VIRAL. Disponível em: ≤ <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 15 dez. 2019.

JANERO, D.R. **Malondialdehyde and trionbarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury**. Free Radical Biology & Medicine. 9: 515-540, 1990.

JENEBIAN, M.A. et al. **Immune tolerance properties of the testicular tissue as a viral sanctuary site in ART-treated HIV-infected adults**. AIDS. 30(18): 2777-2786, 2016

JOGUET, G. et al. **Effect of acute Zika vírus infection on sperm and vírus clearance in body fluids: A prospective observational study**. Lancet Infect. Dis. 17: 1200-1208, 2017.

JONGE, C.J.; BARRAT, C. **The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration**. Cambridge University Press. 372(1): 1-24, 2006.

JOHNSON, S.G. **Testicular biopsy score count – A method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males**. Hormones. 1: 2-25, 1970.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013

KARL, J., CAPEL, B. **Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium**. In: Developmental biology. Academic Press, v.203, p.323-333. 1998.

KAUR, N.; SHARMA, N.; GUPTA, A.K. **Affects of dexamethasone on lipid metabolism in rat organs**. Indian J Biochem Biophys, 26(6): 371-6, 1989.

KEMPINAS, W.G. et al. **Rat epididymal sperm quantity, quality and transit timer after guanethidine-induced sympathectomy**. Biology of reproduction. 59: 890-896, 1998.

KIERZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 4ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

KINDHAUSER, M., et al. **Zika: The origin and spread of a mosquito-borne virus**. Bulletin of the World Health Organization, (February), 675–686, 2016.

LAZEAR, H.M. et al. **A mouse model of Zika virus pathogenesis**. Cell host microbe. 19(5): 720-730, 2016.

LEBLOND, C.P., CLERMONT, Y. **Definition of the stages of the seminiferous epithelium in the rat**. Ann. N. Y. Acad. Sci. 55: 548-573, 1952.

LEDUR, P.F. et al. **Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and dna damage in human iPSC-derived astrocytes**. Nature. 10: 1218, 2020.

LI, G. et al. **Characterization of cytopathic factors through genome-wide analysis of the Zika viral proteins in fission yeast.** Proc Natl Acad Sci. 114: 376-385, 2017.

LOWRY, O.H. et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** The journal of biological chemistry. 193: 265-275, 1951.

MA, W.; LI, S. et al. **Zika vírus causes testis damage and leads to male infertility in mice.** Cell. 167; 1511-1524, 2016

MACNAMARA, F. **Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria.** Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 48(2); 134-145, 1954.

MALLARD, B.A. et al. **Bovine immunophysiology and genetics: A review of the reaearch and carrer of Jeanne L. Burton.** Veterinary Immunology and Immunopathology. 128: 96-103, 2009.

MEISTER, A. ANDRSON, M.E. **Glutathione.** Annual Review of Biochemistry. Palo Alto. 52: 711-760, 1983.

MLERA, L.; BLOOM, M.E. **Diferencial Zika virus infection of testicular cell lines.** Viruses. 11(1): 42, 2019.

MOORE, K. **Embriologia clínica.** 10ª Edição. Gen Guanabara Koogan, 2016.

MORTIMER, S.T. **A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals.** Human Reproduction Update. 3(5): 403 – 439, 1997.

MURADÁS, P.R. et al. **Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equínos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda doepidídimo.** Archives of Veterinary Science. v.11, n. 3, p. 69-74, 2006.

MUSSO, D.; GUBLE, D.J. **Zika virus.** Clinical Microbiology Reviews. 29(3), 487-524, 2016.

NETTER, F.H. **Atlas de anatomia humana.** 7ª Edição. Ed. Gen Guanabara Koogan, 2018.

NEWMAN, C.; FRIEDRICH, T. C.; O'CONNOR, D. H. **Macaque monkeys in Zika virus research: 1947-present.** Current Opinion in Virology. 25; 34-40, 2017.

OLIVEIRA, D.B. et al. **Prolonged shedding of Zika virus associated with congenital infection.** N Engl J Med. 375: 1202-1204, 2016.

ORGEL, J.P.R.O. et al. **Decorin pore protein (Decoron) shape complements collagen fibril surface structure and mediates its binding.** Plos one. 4(9), 2009.

PASSI, D.; SHARMA, S.; DUTTA, S.R.; AHMED, M. **Zika virus diseases – the new face of an ancient enemy as global public health emergency (2016): Brief review and recent updates.** International journal of preventive medicine. (8): 1-6, 2017

PELLINIEMI, L. J.; KUOPIO, T.; FROJDMAN, K. **The cell biology and function of the fetal Leydig cell.** In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Eds). The Leydig Cell. Ed. Cache River Press. Vienna. 143-157. 1996

PEREGRINE, J. et al. **Zika virus infection, reproductive organ targeting and semen transmission in the male olive baboon.** Journal of virology. 94(1), 2019.

PETERSEN, E., et al. **Rapid spread of Zika virus in the americans – Implications for public health preparedness for mass gatherings at the 2016 Brazil olympic games.** International Journal of Infectious Diseases. 44: 11-15, 2016.

POSSAS, C., et al. **Zika puzzle in Brazil: Peculiar conditions of viral introduction and dissemination – A review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 112: 319-327, 2017.

RELICH, R.F.; LOEFFELHOLZ, M. **Zika vírus.** Clinics in laboratory Medicine. 37(2): 253-267, 2017.

RIBEIRO, S.M.R. et al. **A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico.** Bioscience Journal. 21(3): 133149, 2005.

RICART-JANÉ, D.; LOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, D. **Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. Nitric oxide.** Biology and chemistry. 6(2): 178 – 185, 2002.

ROSA, P.C.S. et al. **Efeitos do diclofenaco e da dexametasona na endotoxemia experimental em equinos.** Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e zootecnia. 55(3), 2003.

RUSSELL, L. D. **Sertoli-germ cell interrelations: a review.** Rev Gamete. 3: 179-202, 1980.

RUSSELL, L.; ETTLIN, R.; SINHA HIKIM, A.; CLEGG, E. **Mammalian spermatogenesis.** In: RUSSELL, L.; ETTLIN, R.; SINHA HIKIM, A; CLEGG, E. (Eds.). Histological and histopathological evaluation of the testis. Florida. [s.n.]; 1–40, 1990.

SEHNG, Z.Y., et al. **Sertoli cells are susceptible to Zikav infection in mouse testis.** Frontiers in cellular and infection microbiology. 7; 1-13, 2017.

SETCHELL, B.P. **Male reproductive organs and semen.** In: CUPPS, P.T. (Ed.). Reproduction in Domestic Animals. San Diego: Academic Press, 1991, p.221-249,1991.

SETCHELL, B.P.; BREED, W.G. **Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract.** In: *Knobil and neill's*. Physiology of reproduction. 3ed. Austrália: Elsevier, 2006.

SHAHIDI, N.T. **A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids.** Clinical therapeutics, n. 9, v. 23, p. 1355-1390, 2001.

SHARPE, R. M. **Regulation of spermatogenesis.** In: KNOBIL, E; NEIL, JD. (Eds). The physiology of reproduction. New York: Raven Press. p.1363-1434. 1994.

SHI, W., et al. **Increasing genetic diversity of Zika virus in the Latin American outbreak.** Emerg. Microbes Infect. 5; 68, 2016.

SIDDIQUI, I.A.; RAISUDDIN, S.; SHUKLA, Y. **Protective effects of black tea extract on testosterone induced oxidative damage in prostate.** Cancer Lett. 227(2): 125-132, 2005.

SIES, H. **Oxidative stress.** London, Academic Press, p. 1 – 507, 1985.

SILVA, L.R.C. **Zika vírus trafficking and interactions in the human male reproductive tract.** Pathogens. 7(2), 2018.

SILVESTRE, M. A. P. **Zika: O paradigma atual.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto Superior de Ciências da Saúde, Almada, 2017.

SMITH, D.E. et al. **Zika virus disease for neurologists.** Neurology: Clinical practice. 6(6): 515-522, 2016.

SMITH, E.L, et al. **Bioquímica: mamíferos.** 7 a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985

SNYDER, P.J. et al. **Effect of Testosterone Treatment on Body Composition and Muscle Strength in Men Over 65 Years of Age 1.** The Journal of Clinical Endocrinology e Metabolism, v. 84, n. 8, p. 2647-2653, 1999.

SOUZA, I.N.O. et al. **Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice.** Sci Transl Med. 10: 2749, 2018.

TAE, H.J. et al. **Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus 56 colchicus karpowii*) during the breeding and non-breeding seasons.** Veterinary Research. Commun. 7: 629-643, 2005.

TORRES, J. R.; MURILLO, J.; BOFILL, L. **The everchanging landscape of Zika virus infection.** Learning on the fl. International Journal of Infectious Diseases. 51; 1-13, 2016.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. **Princípios de anatomia e fisiologia.** 12º edição. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 2010.

TURNER, R.M. **Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation.** Reproduction Fertility and Development. 8(2): 25 – 38, 2006.

URAKI, R., et al. **Zika virus causes testicular atrophy.** Sci. Adv. 3: 1-6, 2017.

WALKER, G.; PFEILSCHIFTER, J.; KUNZ, D. **Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)- γ -stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. Evidence for glucocorticoid-induced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation.** Journal Biol Chem. 272(26): 16679-87, 1997.

WALLIN, B. et al. **Lipoprotein oxidant and measurement of thiobarturic acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants.** Anal Biochem. 208: 10-15, 1993.

WINKLER, C. W.; MYERS, L. M.; WOODS, T. A. **Adaptative immune responses to Zika virus are important for controlling virus infection and preventing infection in brain and testes.** The journal of immunology. 198; 000-000, 2017.

WINKLER, C. W.; PETERSON, K. E. **Using immunocompromised mice to identify mechanisms of Zika virus transmission and pathogenesis.** Immunology. 153; 443-454, 2018.

WU, D., et al. **A family cluster of imported ZIKV cases: Viremia period may be longer than previously reported.** J. Infect. 73; 300–303, 2016.

ZHANG, Y., et al. **Highly diversified Zika viruses imported to China.** Protein Cell. 7; 461–464, 2016.

ZHANG, Z.; RONG, L.; LI, Y. **Flaviviridae viruses and oxidative stress: implications for viral pathogenesis.** Oxidative medicine and cellular longevity. Hindawi 2019.

APÊNDICE A - DADOS SUPLEMENTARES - RESULTADO DO VOLUME DOS COMPONENTES TESTICULARES EM ML

	C7	I7	C14	I14	C21	I21	C28	I28	C35	I35	C42	I42
TS (mL)	0,099± 0,014	0,153± 0,003*	0,099±,025	0,14±0,012*	0,154± 0,012	0,134± 0,034	0,123±0,017	0,109± 0,034	0,093± 0,037	0,094± 0,065	0,112±0,02	0,14±0,02
ES(mL)	0,086± 0,013	0,134± 0,003*	0,084±,021	0,122±,010*	0,136± 0,011	0,115±0,03	0,104±0,014	0,088± 0,028	0,08±0,034	0,079± 0,056	0,101± 0,028	0,12±0,02
TP(mL)	0,002± 0,0008	0,003± 0,0004*	0,002±0,02	0,004±0,01*	0,003±0,01	0,003± 0,008	0,002± 0,0002	0,004± 0,001*	0,002± 0,001	0,002± 0,002	0,003±0,02	0,003±0,02
L(mL)	0,01± 0,001	0,014±0 ,0004*	0,012±0,003	0,019±,001*	0,013± 0,002	0,015± 0,003	0,016±0,002	0,016± 0,004	0,01±0,004	0,011± 0,007	0,012± 0,003	0,016± 0,002*
IT(mL)	0,13±0,006	0,163±0 ,017*	0,1420±0,015	0,156±0,014*	0,154± 0,025	0,172± 0,003	0,018±0,003	0,011± 0,003*	0,011± 0,005	0,013± 0,009	0,013± 0,007	0,017± 0,005
VS(mL)	0,003± 0,001	0,004± 0,002	0,002±0,001	0,003±0,002	0,007± 0,002	0,006± 0,001	0,001±0,001	0,001± 0,0005	0,0007± 0,0004	0,0008± 0,0007	0,001± 0,0008	0,001± 0,0006
EL(mL)	0,007± 0,002	0,008± 0,004	0,002±0,002	0,006± 0,002*	0,003± 0,004	0,004± 0,002	0,001±0,001	0,0009± 0,0005*	0,0007± 0,0006	0,001± 0,001	0,001± 0,0006	0,001± 0,0004
NCL(mL)	0,002± 0,003	0,004± 0,001*	0,003±0,003	0,003± 0,0008	0,004± 0,003	0,003± 0,0006	0,001± 0,0009	0,0006± 0,0002	0,0004± 0,0003	0,0009± 0,0007	0,0006± 0,0002	0,0009± 0,0003
CCL(mL)	0,015± 0,003	0,021± 0,005	0,017±0,003	0,02±0,002	0,023± 0,005	0,021± 0,003	0,006±0,001	0,004± 0,001	0,002± 0,002	0,004± 0,003	0,004± 0,001	0,005± 0,001
CL(mL)	0,018± 0,003	0,026± 0,006*	0,021±0,004	0,024±0,003	0,027± 0,006	0,025± 0,003	0,007±0,001	0,004± 0,001	0,003± 0,002	0,005± 0,003	0,004± 0,001	0,006± 0,002
TC(mL)	0,008± 0,003	0,011± 0,001	0,009±0,002	0,015± 0,003*	0,015± 0,005	0,019± 0,006	0,007±0,001	0,004± 0,001*	0,003± 0,002	0,005± 0,004	0,005± 0,002	0,006± 0,002
MAC(mL)	0,0008± 0,0005	0,0004± 0,0003	0,0002± 0,0004*	0,001± 0,0005*	0,001± 0,001	0,001± 0,0002	0,0002± 0,0002	0,0001± 0,00008	0,0002± 0,0002	0,0003± 0,0003	0,0002± 0,0001	0,0003± 0,0001

Legenda: C7 – Grupo controle 7 dias; I7 – Grupo infectado 7 dias; C14 – Grupo controle 14 dias; I14 – Grupo infectado 14 dias; C21 – Grupo controle 21 dias, I21 – Grupo infectado 21 dias; C28 – Grupo controle 28 dias; I28 – Grupo infectado 28 dias; C35 – Grupo controle 35 dias, I35 – Grupo Infectado 35 dias; C42 – Grupo controle 42 dias, I42 – Grupo infectado 42 dias. TS(mL) – Túbulo seminífero; ES(mL) – Epitélio seminífero; TP(mL) – Túnica própria; Lúmen (mL);

IT(mL) – Intertúbulo; VS(mL) – Vaso sanguíneo; EL(mL) – Espaço linfático; NCL(mL) – Núcleo de células de Leydig; CCL(mL) – Citoplasma de células de Leydig; CL(mL) – CL(mL) – Células de Leydig, TC(mL) – Tecido conjuntivo; MAC(mL) – Macrófagos.

ANEXOS

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 02 de abril de 2019

Ofício nº 14/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Luiz Carlos Alves**

Departamento Laboratório de Imunopatologia do Lika

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 0049/2018

Certificamos que a proposta intitulada "Análise histomorformétrica e Ultraestrutural do Testículo de Camundongos Balb/c Adultos Infectados por Virus Zika," registrado com o nº 0049/2018 sob a responsabilidade de Prof. Luiz Carlos Alves que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/03/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/03/2019 a 29/02/2021
Espécie/linhagem/raça	Mus musculus- Camundongoalbino
Nº de animais	120
Peso/Idade	30-40g/ 50 dias
Sexo	Macho
Origem	Bioterio do Instituto Aggeu Magalhães de Pernambuco

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

