



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia- IB

Departamento de Biologia Celular- CEL

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Caracterização do impacto da infecção pelo vírus ZIKA no metabolismo energético do testículo e fertilidade masculina

Raquel das Neves Almeida

Brasília – DF

Junho/ 2020



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Biologia- IB
Departamento de Biologia Celular- CEL
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Caracterização do impacto da infecção pelo vírus ZIKA no metabolismo energético do testículo e fertilidade masculina

Aluna: Raquel das Neves Almeida

Tese de Doutorado desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília – DF

Junho/ 2020

Dedico aos meus avós que são minhas referências.

Dedico aos meus pais Romana e Edilberto.

Dedico a minha irmã Leonara.

Por fim, dedico a todas as pessoas que me amam e amaram, que me deram forças e sempre uma razão para ser melhor a cada dia.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará
fazendo o impossível.”
São Francisco de Assis

“Beautiful is what we see,
More Beautiful is what we know,
Most Beautiful by far is what we don't.”

Nicolaus Steno

Agradecimentos

A Deus por me dar forças em cada passo, por me fazer capaz quando eu pensava que minhas forças já tinham se exaurido. À minha Mãe do Céu que me amparou em seu regaço acolhedor.

A minha amiga orientadora Kelly Grace Magalhães, que me orientou todos esses anos, sempre dando seu melhor, acreditando no meu potencial, me dando oportunidades e sempre me fazendo crescer cientificamente. Só tenho a agradecer por todos os momentos, pela compreensão, pela confiança. Obrigada por ser uma mulher que luta pela ciência e me fazer lutar por ser mulher na ciência também. Você será sempre minha inspiração.

Ao meu orientador do Canadá no período de Doutorado Sanduíche, Gary Kobinger, por todo apoio e disponibilidade durante esse período. Agradeço pela confiança, pelas conversas de ciência, vida, projetos e o mais importante, obrigada por me conceder uma das melhores experiências da minha vida.

Aos meus amigos e irmãos Rafael Correa e Miguel Andrade, que desde a graduação estiveram ao meu lado. Vocês me ajudaram em momentos que pensei em desistir, me ofertaram amor, carinho, palavras de conforto e uma amizade concreta. Levo vocês comigo para sempre. Obrigada pelas risadas, pelos passeios, pelos momentos, pela amizade. Aos meus bioamigos Agnelo e Raffael Castro que estão comigo nessa luta desde a graduação e sempre me receberam com um abraço aconchegante e muito carinho. Obrigada pelas conversas boas e pela parceria.

Aos meus amigos de laboratório e colaboradores em tantos projetos nesses anos: Igor, Pasqua, Dalila e Luis Felipe que sempre me fazem uma pessoa melhor e que me cercam de amor e carinho. As minhas amigas e novas colaboradoras Heloísa e Sabrina que não medem esforços para nada, e estão sempre empenhadas em grandes realizações. Obrigada por todo suporte experimental e psicológico e pelo apoio em todos os passos. Aos meus amigos integrantes e ex-integrantes do LIM (Laboratório de Imunologia e Inflamação): Lívia, Cecília, Gabriel (Altão), Ana Júlia, Augusto, Gabriel Calixto, Débora, Gabriela, Gabriel, Luana, Milena, Natália e Ramon obrigada por toda paciência comigo, por entrarem nas minhas brincadeiras e por fazerem meu dia muito mais leve. Ao meu amigo de UNB Allan Mascarenhas, meu amigo do coração e eterno confidente.

Aos meus amigos de laboratório do Canadá: Claude, Hugues, Alejandro, Jannie, Matthew, Marc-Antoine, Jose, Myriam, Alice, Christina, Giorgi, Mary, Zoé, Hiva, Trina, Chanel; vocês me receberam com muito amor e me fizeram apaixonar por esse laboratório. Aos meus amigos do Canadá: Wanessa, Sérgio, Andrea, Dela, Julio, Bruna, Jedi, Nil, Mário e Bruno Guedes que foram minha família Canadense, a gente se emprestou como família e perpetuamos

esse laço mesmo na distância. Agradeço ao Gabriel e Rafael por toda paciência, carinho e cuidado comigo em diversos momentos, vocês foram meu suporte, meu ombro amigo, obrigada meus meninos. Gabriel só tenho gratidão por tudo que você se tornou em minha vida, melhor piauiense que conheço, obrigada por me apresentar a pérola que é Hermana.

Aos meus amigos antigos que acompanharam minha jornada e estiveram ao meu lado nessa luta sendo cuidado e consolo de Deus: Padre Ricardo, Míngos, Natália, Alisson, Déia, Daniel, Taynã, Monalisa, Tiago, Rogério, Ana e Raíssa e todos os outros. Aos meus novos amigos: Pedro PP, Rafa Silva, Julyara e Rayan, obrigada pelos abraços e dedicação quando eu mais precisei.

À minha família, meus pais Romana e Edilberto e minha irmã Leonara que acompanharam nos dias de cansaço, que estavam ao meu lado nos dias de felicidade e que são o meu maior amor e suporte. Para vocês e com vocês tudo vale a pena. Aos meus familiares, tios e primos que sempre me deram apoio para essa conquista e realização. Em especial a minha tia Lusía que é minha “véia” e “novidade” que faz meu marketing pessoal divulgando meus artigos onde passa, e meu Tio Evandro que sempre está ao meu lado me incentivando em tudo que faço. Agradeço a minha eterna “pima” Sarah, que durante a pandemia de COVID1-19 têm sido a minha alegria, minha leveza, obrigada por cada abraço e cada beijinho. Á minha avó Maria que sempre falou que queria uma neta doutora. Aos meus avôs Pedro e Geraldo que não conseguiram me ver nesse momento. Por fim a minha avó Júlia, que se foi antes desse dia, tão pertinho de me ver realizar esse sonho ela foi descansar com Deus. Obrigada por ser meu exemplo e minha saudade diária.

Ao meu namorado Pedro, que sempre cuidou dos meus medos. Muito obrigada por todo apoio, por toda dedicação. Agradeço por toda força que me deu esses anos, por me respeitar como pessoa, mulher, cientista e por dividir sua família comigo.

Aos meus colaboradores externos aos laboratórios que fizeram esse trabalho melhor e bem mais rico: Guy Boivin, Jocelyne Piret, Marie-Christine Venable, Julie Carbonneau da Université Laval que auxiliaram com os animais e toda parte de animais imunocomprometidos. Carolina Lucci e suas meninas (Juliana e Vanessa) que apareceram em um momento muito importante e trouxeram ricas contribuições.

A Universidade de Brasília que foi minha segunda casa desde 2010 e que me deu a oportunidade de estudar na melhor instituição de ensino superior do Distrito Federal, me fazendo crescer cientificamente e academicamente. Aos técnicos da universidade de Brasília, em especial o Chiquinho que sempre me salvou com suas rapaduras. Aos servidores da Universidade de Brasília que desempenham seu papel com excelência, em especial a Lu e a Ana

da secretaria. À professora Sônia Freitas que sempre me auxiliou em tudo para que o meu Doutorado Sanduíche pudesse acontecer.

A Université Laval que me acolheu e proporcionou enriquecimento profissional. Ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular e todos os professores e coordenadores.

Por fim, as agências de fomento, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro. E a bolsa ELAP que me custeou por um período no Canadá.

Sumário

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 ZIKA VÍRUS	15
1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR ZIKA	17
1.3 A INFLUÊNCIA DO ZIKV NO TRATO REPRODUTOR MASCULINO	18
1.4 INFLAMAÇÃO E INFECÇÃO POR ZIKV NO TRATO REPRODUTOR MASCULINO	22
1.5 METABOLISMO ENERGÉTICO E INFECÇÕES VIRAIS	24
1.6 METABOLISMO ENERGÉTICO E FUNÇÕES TESTICULARES	26
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVO GERAL.....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 ANÁLISES <i>IN VITRO</i>	32
4.1.1 LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS	32
4.1.2 EXPANSÃO DO ZIKV	32
4.1.3 TITULAÇÃO DO ZIKV	33
4.1.4 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	33
4.2 ANÁLISES <i>IN VIVO</i>	34
4.2.1 COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	34
4.2.2 INFECÇÕES <i>IN VIVO</i>	34
4.2.3 DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR DIGITAL EM GOTAS (DDPCR)	35
4.2.4 DOSAGEM GLICÊMICA DO SANGUE DOS ANIMAIS	36
4.2.5 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA E WESTERN BLOT DO HOMOGENEIZADO DE TESTÍCULO.....	36
4.2.6 DOSAGEM DE CITOCINAS DO TESTÍCULO DE ANIMAIS	37
4.2.7 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE ATP	37
4.2.8 ANÁLISE METABOLÔMICA DOS TESTÍCULOS	37
4.2.9 ANÁLISE DE QRT-PCR.....	38
4.2.10 COLETA E ANÁLISE DOS ESPERMATOZOIDES	39
4.2.11 PROTEÔMICA A PARTIR DE GEL DE POLIACRILAMIDA	39
4.2.12 DIGESTÃO.....	39
4.2.13 ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	40
4.2.14 PESQUISA NO BANCO DE DADOS	40
4.3 ANÁLISES EM AMOSTRAS HUMANAS DE SANGUE E SÊMEN	40
4.3.1 COMITÊ DE ÉTICA HUMANO	40
4.3.2 PROTEÔMICA DE AMOSTRAS DE SÊMEN	41
4.3.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	41
4.3.4 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS.....	42
4.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1. OS ISOLADOS ZIKV BR E ZIKV PO APRESENTAM DIFERENÇAS GENÔMICAS	44
5.2 ZIKB BR APRESENTA UM MAIOR TROPISMO PARA O TESTÍCULO EM COMPARAÇÃO COM O ZIKV PO	46
5.3 A INFECÇÃO PELO ZIKV BR PROMOVE DANOS ESPERMÁTICOS AOS ANIMAIS INFECTADOS SEM CAUSAR DANOS MORFOLÓGICOS EVIDENTES E NÃO ALTERA O PERFIL INFLAMATÓRIO TESTICULAR.....	52
.....	53
5.4 A INFECÇÃO PELO ZIKV ALTERA O PERFIL METABÓLICO DO TESTÍCULO DOS ANIMAIS IMUNOCOMPETENTES	56
.....	62

5.5 EFEITO DA INFECÇÃO DE ZIKV BR NO TESTÍCULO DE CAMUNDONGOS IMUNOCOMPETENTES E SUA MODULAÇÃO NA VIA GLICOLÍTICA	64
5.6 EFEITOS DA INFECÇÃO POR ZIKV PO NO TESTÍCULO DE ANIMAIS IMUNOCOMPROMETIDOS EM UM LONGO PERÍODO DE INFECÇÃO.	76
5.7 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E MICROSCÓPICA DO ESPERMATOZOIDE DOS PACIENTES	82
5.7.2. ANÁLISE DE MORFOLÓGICA E DE MOTILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES DOS PACIENTES	83
5.8 ANÁLISE PROTEÔMICA DO SÊMEN DOS PACIENTES INFECTADOS COM ZIKV.....	86
6. DISCUSSÃO	88
7. CONCLUSÕES	98
8. REFERÊNCIAS	99
9. PRODUÇÕES ACADÊMICAS RELACIONADAS COM O TEMA DA TESE DE DOUTORADO	115
10. PRODUÇÕES ACADÊMICAS EM PARALELO AO DOUTORADO	121
11. APROVAÇÃO NO CEUA - UNB	124

Caracterização do impacto da infecção pelo vírus ZIKA no metabolismo energético do testículo e fertilidade masculina

Raquel das Neves Almeida

Resumo

O Zika vírus (ZIKV) é um vírus transmitido por artrópodes (arbovírus) que também foi identificado como sendo transmitido por outras vias, incluindo transmissão sexual, o que implica em um grande impacto na saúde pública. Já está bastante consolidado em modelo animal que o ZIKV consegue infectar, se reproduzir e causar danos severos na homeostase testicular. Entretanto poucas vias foram descritas e correlacionadas a esse processo de patogênese. Portanto, nesse trabalho buscamos caracterizar algumas vias que possam demonstrar os efeitos da infecção por ZIKV testículo, um órgão de privilégio imunológico. Para avaliar a relação da infecção viral e a modulação molecular do sistema reprodutor masculino, analisamos os testículos de camundongos C57BL/6 infectados ou não com o isolado brasileiro ZIKV (ZIKV BR) por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS). Observamos um perfil metabólico diferencial entre os testículos infectados e não infectados pelo ZIKV. Vários metabólitos, especialmente da via glicolítica, foram modulados pelo ZIKV nos testículos, incluindo o aumento da abundância relativa de glicose. Além disso, verificamos por western blot que a infecção por ZIKV causa modulação na expressão de proteínas da via glicolítica. A expressão das proteínas fosfoglicerato quinase (PGK) do tipo 2, e hexoquinase I foi reduzida pela infecção do ZIKV nos testículos. A presença de ZIKV no testículo de camundongos após 14 dias de infecção pelo ZIKV foi confirmada por RT-PCR, mas não foi encontrado material genético viral no plasma ou no cérebro destes animais, sugerindo um tropismo desta cepa pelo testículo. Para investigar as consequências da infecção por ZIKV em testículos humanos, sêmen de homens positivos ou negativos para ZIKV foram coletados e avaliados por proteômica LC-MS/MS *Label-free*. O sêmen de homens previamente positivos para ZIKV mostrou modulação nas proteínas do metabolismo energético e da espermatogênese. Tomados em conjunto, nossos resultados mostraram que a infecção por ZIKV pode afetar a fisiologia dos testículos pela modulação da via glicolítica. Todos esses dados sugerem a influência da infecção pelo ZIKV no metabolismo celular que poderia apoiar o estabelecimento e a replicação do ZIKV nos testículos. Além disso, esse estudo possibilita a condução de uma investigação aprofundada sobre como o ZIKV pode modular os mecanismos celulares que promovem danos nos testículos para fornecer mais indicações sobre alvos terapêuticos.

Characterization of the ZIKA virus infection impact on testis energetic metabolism and male fertility

Raquel das Neves Almeida

Abstract

Zika virus (ZIKV) was first reported transmitted by arthropods, however it has been identified transmitted by other routes, including sexual transmission which became a major impact on public health. It is already well established in the animal model that ZIKV can infect and cause severe damage to testicular homeostasis. However, only few pathways have been described and correlated with this pathogenesis process. Therefore, in this work we aimed to characterize some pathways that can demonstrate the effects of ZIKV infection in the testicle, an immune privileged organ. To assess the relationship of viral infection and molecular modulation of the male reproductive system, we analyzed the testicle of C57BL/6 mice infected or not with Brazilian ZIKV (ZIKV BR) by Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS). We observed a differential metabolic profile between testicles infected and not infected by ZIKV. Several metabolites, especially from the glycolytic pathway, were modulated by ZIKV in testis, including an increase in the relative percentage of glucose. In addition, we verified by Western Blot that ZIKV infection causes modulation the expression of proteins in the glycolytic pathway. Protein phosphoglycerate kinase (PGK) expression of type 2, and hexokinase I was reduced by ZIKV infection in the testicles. The presence of ZIKV in the testis of mice after 14 days of ZIKV infection was confirmed by RT-PCR, but no viral genetic material was found in the plasma or brain, suggesting a tropism of this strain for testicle. To investigate the consequences of ZIKV infection in human testicles, semen from ZIKV-positive or negative men were collected and evaluated by LC-MS / MS Label-free proteomics. The semen of men previously positive for ZIKV showed modulation in the proteins of energy metabolism and spermatogenesis. Taken together, our results showed that ZIKV infection can affect the physiology of the testes by modulating the glycolytic pathway. All of these data suggest the influence of ZIKV infection on cell metabolism that could support the establishment and replication of ZIKV in the testicles. In addition, this study makes it possible to conduct an in-depth investigation of how ZIKV can modulate the cellular mechanisms that promote damage to the testicles to provide further indications on therapeutic targets.

Lista de Tabelas e Figuras

Figura 01. Composição do vírus ZIKA.....	16
Figura 02. Os sintomas mais comuns associados a infecção do ZIKV.....	18
Figura 03. Potenciais reservatórios de ZIKV no trato reprodutor masculino.....	21
Figura 04. A patogênese promovida pela infecção do vírus ZIKV.....	23
Figure 05. Vias metabólicas alteradas por vários tipos de vírus.....	26
Figura 06. Células de Sertoli metabolizam glicose para conversão em lactato.....	29
Tabela 01. Relação dos genomas utilizados na reconstrução filogenética.....	34
Tabela 02: Dados gerais dos pacientes que fizeram a doação de sêmen.....	41
Figura 07. Resultado do alinhamento das sequências nucleotídicas das cepas ZIKV BR (KX197192) e ZIKV PO (KX087101).....	45
Figura 08. ZIK BR induziu perda geral de peso em animais imunocomprometidos quando comparados aos animais controle após 14 dias de infecção.....	47
Figura 09. O isolado brasileiro ZIKV BR foi detectado em testículo de animais imunocompetentes e imunocomprometidos.....	49
Figura 10. Peso do testículo dos animais não apresentou alteração entre os grupos, mesmo havendo algumas diferenças nas dimensões.....	51
Figura 11. Alterações morfológicas e em parâmetros espermáticos provocados pela infecção com ZIKV BR em animais imunocompetentes.....	53
Figura 12. Análise do perfil inflamatório do testículo dos animais imunocompetentes infectados por ZIKV BR	55
Figura 13. Perfil metabólico do testículo de animais imunocompetentes infectados com o isolado ZIKV BR.....	57
Tabela 03. Modulação na abundância relativa de alguns metabólitos identificados no testículo de animais infectados com ZIKV BR	58
Figura 14. Mapa de calor do perfil metabólico do testículo de animais imunocompetentes infectados com o isolado ZIKV BR.....	60
Figura 15. Testículo de animais infectados com ZIKV BR apresentam uma maior abundância relativa de Glicose.....	61
Figura 16. O nível glicêmico não foi alterado pela infecção da cepa ZIKV BR em animais imunocompetentes.....	62
Figura 17. Quantificação da concentração de ATP em testículo de animais imunocompetentes infectados por ZIKV BR.....	63

Tabela 04. Primers usados para a análise de qRT-PCR.....	64
Figura 18. Modulação da expressão de genes relacionados à via glicolítica pela infecção por ZIKV BR no testículo de camundongos imunocompetentes.....	65
Figura 19. Modulação da expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica pela infecção por ZIKV BR no testículo de camundongos imunocompetentes.....	67
Figura 20. Modulação da expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica pela infecção por ZIKV BR no testículo de camundongos imunocomprometidos.....	69
Figura 21. Modulação da expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica pela infecção por ZIKV PO no testículo de camundongos imunocompetentes.	71
Figura 22. Modulação da expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica pela infecção por ZIKV PO no testículo de camundongos imunocomprometidos.....	73
Figura 23. Modelo resumindo a modulação de moléculas da via glicolítica na infecção por ZIKV BR e ZIKV PO em testículo de animais imunocompetentes e imunocomprometidos.....	75
Figura 24. Peso do testículo dos animais infectados por longo período apresentou uma redução significativa de tamanho quando comparado aos animais no período de infecção de 28 dias.....	77
Figura 26. Modulação expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo da glicose pela infecção por ZIKV PO no testículo de animais imunocomprometidos infectados com 183 dias.....	79
Figura 25. Análise morfológica e proteômica dos testículos de animais imunocomprometidos infectados com ZIKV PO após 183 dias.....	81
Tabela 05. Características gerais e físico-químicas dos espermatozoides dos pacientes.....	83
Figura 27. Análise morfológica e de motilidade dos espermatozoides dos pacientes.....	85
Figura 28. Mapa de calor da análise proteômica do sêmen de pacientes infectados com ZIKV.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK	Proteína Quinase ativada por AMP
ATP	Adenosina Trifosfato
BTB	Barreira hemato-testicular
C6/36	Células de linhagem de <i>Aedes albopictus</i>
CG	Células germinativas
CCL5	Proteína Ligante de quimosina 5
CX3CL1	Fractalkine
DENV	Vírus da Dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ES MS / MS	Espectrometria de massa por eletrospray
FAV	Vírus da febre amarela
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
GLUT4	Transportador de glicose
HCMV	Citomegalovírus humano
<i>HLA-1</i>	Antígeno leucocitário humano
HSV-1	Herpes simplex vírus 1
IFN- α	Interferon- alfa
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-23 α	Interleucina 23 alfa
IL-6	Interleucina 6
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IP-10 CXCL10	Proteína 10 induzida por interferon G
MCT1	Transportador 1 de monocarboxilato
<i>NF-$\kappa\beta$</i>	Fator nuclear kappa beta
NOV	Vírus do Nilo Ocidental
NS1	Proteínas não estruturais
PCA	Principais componentes
PEP	Fosfoenolpiruvato
RNA	Ácido Ribonucleico
STAT1	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
ZIKV	Vírus ZIKA

1. Introdução

1.1 Zika Vírus

O vírus ZIKA (ZIKV) foi identificado inicialmente na África em Uganda em 1947, em macacos da espécie *Rhesus* (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Entretanto, houve a disseminação do vírus, e a identificação da infecção em humanos, o que promoveu um surto epidêmico na Micronésia em 2007, outro na Polinésia Francesa em 2013, posteriormente na América Latina, em 2015, sendo o último surto já descrito (HEUKELBACH et al., 2016; LANCIOTTI et al., 2008; OZKURT; TANRIVERDI, 2017). Esse último surto foi determinante para o entendimento de alguns mecanismos da patogênese do ZIKV, sendo então associada a infecção viral à microcefalia e anomalias congênitas em bebês nascidos de mães infectadas. Além de várias patologias em recém-nascidos e malformações congênitas, um grande número de doenças neurológicas em adultos foi relatado como encefalite, meningite e síndrome de Guillain-Barré provocadas pela infecção (ARAUJO; SILVA; ARAUJO, 2018; DA SILVA et al., 2017; OEHLER et al., 2014; OZKURT; TANRIVERDI, 2017). Assim, o ZIKV foi considerado uma emergência de saúde pública de preocupação internacional em 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

O ZIKV é pertencente ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, que inclui vários outros vírus, como o vírus da Dengue (DENV), vírus da febre amarela (FAV) e vírus do Nilo Ocidental (NOV). Esses vírus são característicos por serem transmitidos por artrópodes (AHLERS; GOODMAN, 2018; MUTEBI et al., 2004; SUWANMANEE; LUPLERTLOP, 2017). ZIKV é um vírus envelopado de cadeia simples de RNA de sentido positivo de aproximadamente 10,7 kbases que codifica sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4 e NS5) e três proteínas estruturais (pré-membrana, envelope e capsídeo) (HASAN et al., 2018; LEE; NG, 2018) (Figura 01). ZIKV, apresenta uma estrutura molecular muito similar aos outros flavivírus, inclusive ao DENV, porém dados de microscopia crioeletrônica revelaram que o ZIKV é bem mais estável á diferentes temperaturas que DENV (KOSTYUCHENKO et al., 2016). Além disso, o DENV, possui quatro sorotipos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), o ZIKV possui apenas um sorotipo (HASAN et al., 2018). Mesmo com um sorotipo, ZIKV possui isolados que são divididos filogeneticamente em duas grandes linhagens: Linhagem Africana e Linhagem Asiática, que podem variar em apenas 4% na sequência de aminoácidos (HADDOW et al., 2012; SHERIDAN et al., 2018). Mesmo com alta similaridade e homologia, as duas linhagens têm apresentado diferença na patogênese,

transmissão e respostas moleculares *in vitro* e *in vivo* (CALVEZ et al., 2018; ESSER-NOBIS et al., 2019; HU et al., 2019; SHEHU et al., 2018; VIELLE et al., 2018). A linhagem Africana tem sido considerada como mais agressiva para fetos do que a linhagem Asiática. Porém, sugere-se que a infecção pelas cepas da linhagem Africana resultaria em danos severos aos fetos resultando na perda da gravidez, entretanto, as cepas da linhagem Asiática tem sido mais associada à acometimentos neurológicos e doenças congênitas em fetos, com a patogênese sendo evidenciada na sua forma crônica (SHAO et al., 2017; SHERIDAN et al., 2018; SIMONIN et al., 2017).

Uma evidência interessante, está no fato das cepas da linhagem Africana conseguirem se reproduzir de forma mais eficiente no trato intestinal de insetos que as cepas da linhagem Asiática. Esse dado sugere que as cepas da linhagem Africana são melhor transmitidas através de insetos do que as cepas da linhagem Asiática (circulantes na América) (CALVEZ et al., 2018; HERY et al., 2019). Sendo assim foi identificado que as cepas da linhagem Asiática têm uma característica de transmissão mais aprimorada para transmissão sexual (HU et al., 2019). Isso é sugerido pela quantidade de casos clínicos relatados com transmissão sexual após viagens aos países Americanos que apresentaram surtos de ZIKV (DECKARD et al., 2016; HILLS et al., 2016; MANSUY et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Mesmo assim, muitos trabalhos já demonstraram que as duas linhagens são capazes de infectar e causar danos ao trato reprodutor masculino (GOVERO et al., 2016; MA et al., 2016; MORRISON; DIAMOND, 2017; SHERIDAN et al., 2018; TSETSARKIN et al., 2018).

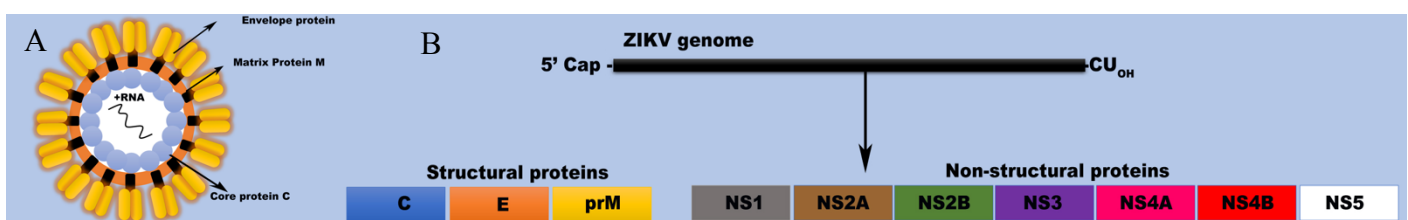


Figura 01. Composição do vírus ZIKA. (A) Representação da estrutura do ZIKV, que é composta por Envelope, Capsídeo, Proteína de membrana e RNA de sentido positivo de fita simples. (B) Representação do RNA viral que é traduzido em uma poliproteína. Essa poliproteína é clivada por proteases virais e celulares em quatro proteínas estruturais: Capsídeo (C), Envelope (E), membrana precursora (prM); e membrana (M) e em sete proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Figura adaptada de: Almeida et al, Zika Virus Vaccines: Challenges and perspectives; Vaccines 2019.

1.2 Características Clínicas da infecção por ZIKA

Após as epidemias de ZIKV muitos estudos abordaram as características clínicas e as severidades provocadas pela infecção do ZIKV. Após o período de incubação, que é em média, 3 dias, as manifestações clínicas começam a aparecer (RUDOLPH et al., 2014). A maioria das manifestações clínicas provocadas pela infecção são leves com sintomas parecidos com os provocados pelas outras arboviroses (BECKHAM et al., 2017). Em um estudo com uma grande quantidade de casos confirmados foi identificado que os sintomas mais comuns foram: erupção cutânea (97%), prurido (79%), prostração (73%), dor de cabeça (66%), artralgias (63%), mialgias (61%), conjuntivite não purulenta (56%) e dor na região lombar (51%) (BRASIL et al., 2016). Porém, Jimenez Corona et al investigaram que os principais aspectos clínicos associados à infecção foram febre (96,6%), erupção cutânea (93,3%), conjuntivite não purulenta (88,8%), dor de cabeça (85,4%) e mialgia (84,3%) (JIMENEZ CORONA et al., 2016). Sendo assim os sintomas comuns relatados pelo CDC são: Febre, Erupção cutânea, Dor de cabeça, Dor nas articulações, Olhos vermelhos e Dor muscular (Figura 2). Associada à infecção, a febre baixa é mais comum, porém existem alguns relatos de febre alta (WEITZEL; CORTES, 2016; ZANLUCA et al., 2015).

Mesmo com essa grande quantidade de sinais e sintomas associados a infecção, foi estimado que cerca de 80% das infecções são assintomáticas (DUFFY et al., 2009). Aparentemente, olhando somente esses sintomas a infecção pelo ZIKV apresenta-se como uma doença leve, porém no decorrer das epidemias observou-se que o vírus é capaz de desempenhar efeito patológico nos tecidos neuronais em fetos e em adultos (MORRISON; DIAMOND, 2017; MUÑOZ et al., 2017). No surto na Polinésia Francesa em 2013-2014, foi relatado o aumento de 20 vezes mais casos de síndrome de Guillain-Barré (GBS) comparado aos outros anos (GARCIA et al., 2016). Ademais, durante o surto inicialmente reportado no Brasil em 2015-2016, foram relatadas as primeiras associações com malformação neural, defeitos congênitos, danos neurológicos e as primeiras investigações de transmissão vertical, de mãe para feto (ARAUJO; SILVA; ARAUJO, 2018; HERRERA et al., 2016; HUSSAIN et al., 2018; WEN; SONG; MING, 2017). Em 2016 a infecção por ZIKV se tornou um importante problema de saúde pública devido à associação com vários casos de microcefalia em neonatos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Com as confirmações de transmissão perinatal, outras formas de transmissão, que não acontecem por vetores virais, ficaram mais evidentes, sendo posteriormente confirmadas as transmissões sexuais (D'ORTENZIO; MATHERON; YAZDANPANA, 2016).

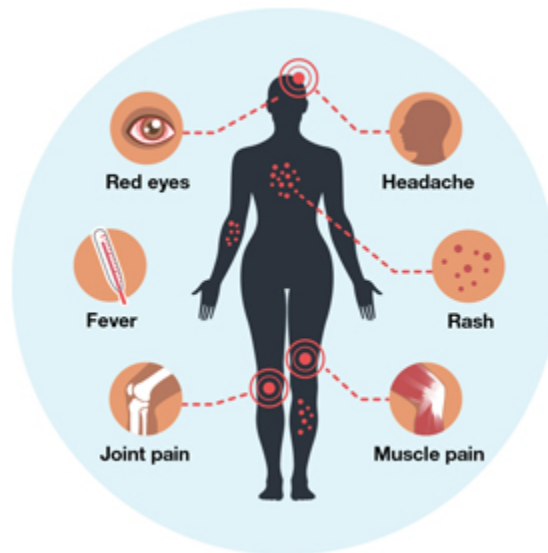


Figura 02. Aspectos Clínicos mais comuns associados à infecção do ZIKV. Os sinais e sintomas das flaviviroses são bem parecidos, entretanto, com relação à infecção pelo ZIKV os principais são: vermelhidão nos olhos, dores de cabeça, erupções cutâneas com coceira associada, dores musculares, dores nas articulações, febre e em alguns casos tosse e vômito. Figura retirada <https://www.cdc.gov/zika/about/overview.html>. Acesso em 25 de fevereiro de 2020

1.3 A influência do ZIKV no trato reprodutor masculino

Inicialmente, pensava-se que a transmissão do ZIKV ocorria somente pela picada de insetos fêmeas da espécie *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*. Entretanto, novas evidências apontaram que ZIKV pode replicar no intestino e glândulas salivares de *Culex quinquefasciatus*. Além disso, foi identificado e isolado ZIKV em diferentes espécies de mosquitos *Culex perfuscus*, *Mansonia uniformis*, *Anopheles coustani* e *Anopheles sp.* (AYRES, 2016; GUEDES et al., 2017; PHUMEE et al., 2019; ROUNDY et al., 2017; SLAVOV et al., 2016; VOROU, 2016). Isso sugere uma possível complexidade sobre a transmissão, estabelecimento e dinâmica de reprodução do ZIKV. Outro fato importante sobre a transmissão do ZIKV que se tornou aparente durante o surto de 2015, foi o fato de serem identificados vários casos de transmissão sexual do ZIKV, entre os gêneros: masculino para feminino; feminino para masculino; masculino para masculino (CDC; DAVIDSON et al., 2016; DECKARD et al., 2016; HILLS et al., 2016). Sendo que a maioria dos casos estão relacionados com a transmissão a partir de homens infectados para parceiros do sexo feminino, o que pode estar relacionado à persistência

do vírus a longo prazo no sêmen e no testículo (ATKINSON et al., 2016; DECKARD et al., 2016; HILLS et al., 2016; MANSUY et al., 2016). Este novo modo de transmissão do ZIKV em humanos nunca tinha sido relatado anteriormente relacionado à infecção por *Flavivírus*.

Além disso, o ZIKV é o primeiro arbovírus detectado no sêmen humano (MARTIN-BLONDEL, 2016; MATHERON et al., 2016; TOWERS et al., 2016). O RNA do ZIKV foi detectado no sêmen em pacientes sintomáticos (ATKINSON et al., 2016; MANSUY et al., 2016; NICASTRI et al., 2016) e assintomáticos (MUSSO et al., 2017; NICASTRI et al., 2016). Em um paciente com RNA sérico negativo para ZIKV, o ZIKV foi detectado no sêmen, sugerindo tropismo viral para o sistema reprodutor masculino. O ZIKV persiste e se replica no trato reprodutivo masculino (STASSEN et al., 2018). ZIKV foi detectado no sêmen após 6 meses de infecção (NICASTRI et al., 2016), e em um paciente imunossuprimido após 900 dias de infecção foi detectado o material genético viral no sêmen (PETRIDOU et al., 2019) , sugerindo que os homens infectados são um potencial reservatório para futuras transmissões sexuais, mesmo por um longo período após a infecção (ATKINSON et al., 2016; FOY et al., 2011). Algumas evidências indicam que o vírus ZIKV chega ao testículo pela via hematogênica enquanto a infecção no epidídimo acontece via hematogênica/ linfogênica e ductos testiculares (TSETSARKIN et al., 2018), promovendo danos testiculares, resultando em uma redução da fertilidade no modelo de camundongos (STASSEN et al., 2018). Os efeitos da infecção por ZIKV no testículo também são identificados na fase crônica, o RNA e antígenos virais podem ser detectados 14 dias após a infecção, e após 35 dias foi identificado material genético viral no testículo de animais (CLANCY et al., 2019; ROBINSON et al., 2018). Tal fato foi evidenciado também pelo desenvolvimento de uma inflamação crônica testicular (orquite) em estágio final em camundongos infectados com ZIKV após 35 e 70 dias após a infecção (CLANCY et al., 2019). Ainda em camundongos foi comprovado que o ZIKV pode infectar tipos distintos de células do trato reprodutor masculino, preferencialmente espermatogônias, espermátócitos primários e células de Sertoli (GOVERO et al., 2016; SHENG et al., 2017) (Figura 03). As células de Sertoli podem suportar altos níveis de replicação do ZIKV e nos outros tipos de células, como espermatogônias, a infecção pode promover a morte celular levando à destruição dos túbulos seminíferos (KUMAR et al., 2018; STRANGE et al., 2018). Contudo, alguns dados evidenciaram que ZIKV PO induz efeitos mínimos ao ciclo celular e não altera a proliferação e sobrevivência celular em células germinativas (ROBINSON et al., 2018). Esses dados, tomados em conjunto, mostram que essas células germinativas são aptas a manter uma produção durável de ZIKV, podendo ser esse o fator principal para a duração de longo tempo de material genético nos testículos (ROBINSON et al., 2018) O epidídimo e vesícula seminal também foram

detectados como sendo fonte de persistência viral em que o material genético viral foi detectado no flush epididimal e plasma seminal após 14 e 35 dias de infecção (CLANCY et al., 2019).

Dados epidemiológicos sugerem que houveram uma série de transmissões sexuais após a epidemia de 2015, por meio de ejaculados de homens infectados com ZIKV (HILLS et al., 2016; MANSUY et al., 2016). Além dos riscos quanto à transmissão sexual, ZIKV foi demonstrado causando infertilidade em camundongos machos (DE LA VEGA et al., 2019; GOVERO et al., 2016; STASSEN et al., 2018). Em humanos, foi observada uma baixa contagem de espermatozoides em pacientes infectados pelo ZIKV sugerindo também a influência da infecção na fertilidade masculina (AVELINO-SILVA et al., 2018; BAUD et al., 2017; JOGUET et al., 2017). A persistência do ZIKV no trato reprodutor masculino e as evidências da transmissão via sexual é um indicativo da necessidade atual de um maior controle de epidemias e desenvolvimento de vacinas.

Vacinas contra ZIKV têm sido desenvolvidas e muitas têm mostrado, conferindo proteção completa em camundongos, seguindo para os testes clínicos em humanos (DAS NEVES ALMEIDA et al., 2018). Nesse contexto a vacina GLS-5700, uma vacina de DNA que contém uma sequência que codifica pré-membrana e envelope de ZIKV mostrou que pode prevenir e potencialmente reverter a infertilidade promovida pelo vírus (DE LA VEGA et al., 2019).

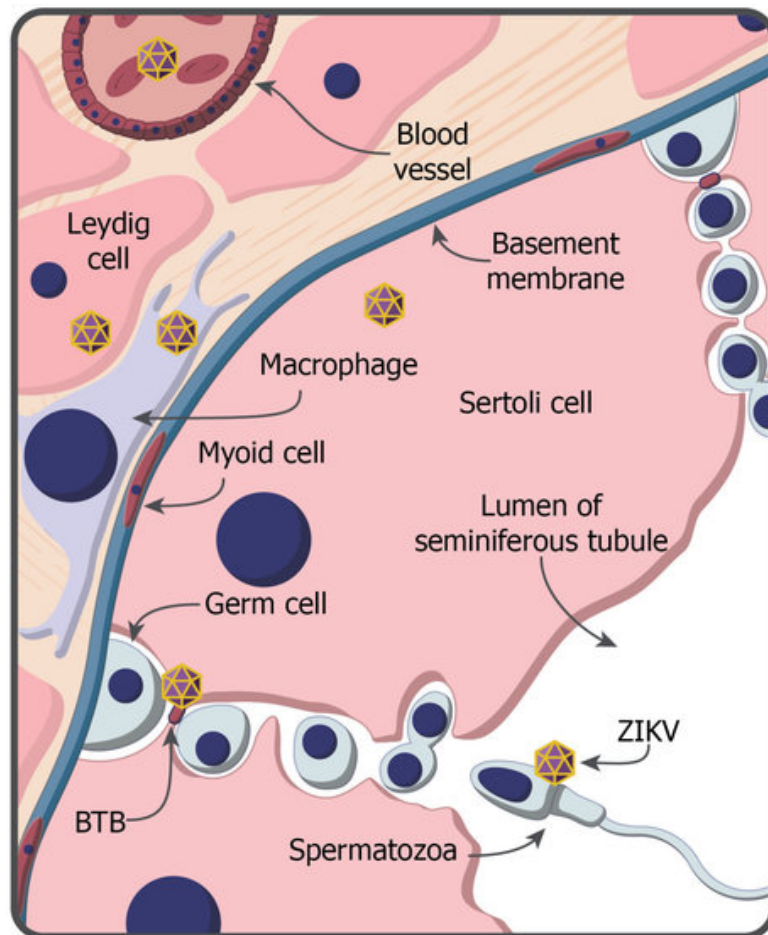


Figura 03. Potenciais reservatórios de ZIKV no trato reprodutor masculino. Representação de um corte de uma porção do túbulo seminífero mostrando as células que suportam a replicação do ZIKV. ZIKV pode chegar ao testículo por vasos sanguíneos e iniciar a infecção em células como macrófagos testiculares e células de Leydig. Após conseguir evadir a barreira hemato-testicular (BTB), o vírus consegue infectar, se reproduzir e permanecer no interior das células de Sertoli e em células germinativas. Foi demonstrado também que espermatozoides maduros podem ser infectados pelo ZIKV. Figura adaptada de: Stassen et al, Zika Virus in the Male Reproductive Tract, *Viruses* 2018.

1.4 Inflamação e Infecção por ZIKV no trato reprodutor masculino

Orquite, prostatite, cistite e hematospermia já foram reportados em homens infectados com ZIKV (FOY et al., 2011; HUIITS et al., 2016; MUSSO et al., 2015). Mc Donald e colaboradores demonstraram que células epiteliais do epidídimo e leucócitos devem ser a principal fonte de liberação de RNA do ZIKV (MCDONALD et al., 2018). Além disso, a presença de leucócitos no sêmen sugere inflamação no trato reprodutor masculino e comprometimento da barreira hemato-testicular (BTB) (HUIITS et al., 2017). Mediadores inflamatórios liberados por macrófagos testiculares pós infecção de ZIKV podem também ser um fator relevante para o comprometimento da BTB, denotando um órgão com inflamação evidente (SIEMANN et al., 2017a). Strange e colaboradores, demonstraram que a persistência viral está associada a uma ativação de vias pró-inflamatórias canônicas em células de Sertoli, com o aumento da expressão de genes como antígeno leucocitário humano (HLA-1), Interleucina 23 alfa (IL-23 α), NF- κ β , Interleucina 6 (IL-6), STAT1, STAT2 e genes da via de regulação do Interferon (STRANGE et al., 2018).

No modelo in vitro usando células de Sertoli, Siemann e colaboradores, demonstraram que a infecção pelo vírus ZIKA induz altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como as Interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8, e TNF- α , além disso, quimiocinas como RANTES (CCL5), CX3CL1, e IP-10 (CXCL10) foram encontradas aumentadas no sobrenadante após 72h de infecção. Porém a liberação de Interferon alfa ocorreu de forma modesta, apenas após 48h e 72h de infecção. As células de Sertoli apresentarem uma forte resposta imune contra a infecção, o vírus consegue se estabelecer e replicar no interior desse tipo celular por um longo período de tempo (SIEMANN et al., 2017b). Provavelmente, um fator que pode contribuir para esse fenômeno é a grande expressão de receptores AXL em células de Sertoli, que são receptores TAM usados para a entrada de ZIKV em vários tipos celulares (STRANGE et al., 2019).

Macrófagos testiculares também são infectados por ZIKV (MATUSALI et al., 2018b) e a infecção promove aumento de alguns transcritos relacionados à inflamação, como os genes IFN- α e IFIT1 e da secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 α , e IL-8 (SIEMANN et al., 2017b)(Figura 4).

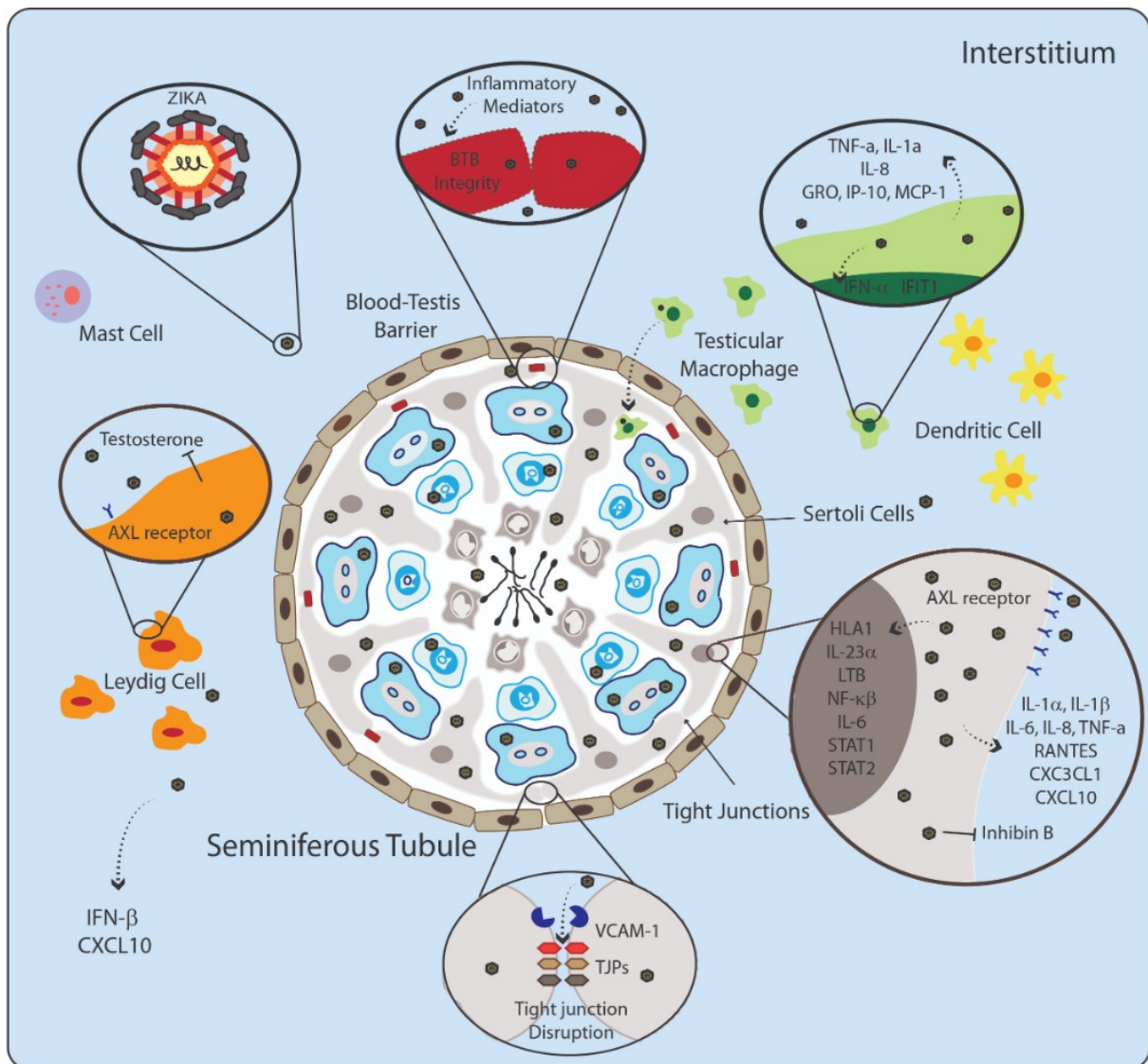


Figura 04. A patogênese promovida pela infecção do vírus ZIKV. A infecção por ZIKV no testículo apresenta uma marcante resposta imunológica que pode promover um ambiente favorável ao estabelecimento da infecção. Figura adaptada e retirada do artigo: Almeida et al, The ZIKA virus impact on male reproductive tract immunology and physiology. Em fase de publicação.

1.5 Metabolismo energético e infecções virais

A infecção pelo ZIKV pode causar anormalidades em espermatozoides humanos, porém os mecanismos moleculares e celulares envolvidos nesse processo ainda não são bem elucidados. Mesmo com pouca literatura nessa área, identificou-se que em fibroblastos humanos e células de mosquito (C6/36), a infecção por ZIKV pode levar ao aumento da glicólise. Porém em fibroblastos o aumento da glicólise está associado à geração de intermediários do ciclo do ácido cítrico e em C6/36 o aumento da glicose está relacionado ao direcionamento das vias das pentoses (THAKER et al., 2019).

Sabe-se que as infecções virais afetam drasticamente a fisiologia da célula do hospedeiro e modulam uma grande variedade de vias e funções celulares, reprogramando a maquinaria celular e metabólica para a produção ideal de vírus. Tanto vírus que apresentam material genético de RNA, quanto de DNA podem reprogramar o metabolismo celular, podendo aumentar a captação de glicose, aumento da via glicolítica, da atividade das enzimas da via das pentoses e indução da síntese de lipídeos (Figura 05) (THAKER; CH'NG; CHRISTOFK, 2019). *Adenovirus*, um vírus de DNA fita dupla, já foi demonstrado capaz de induzir aumento da glicólise durante a infecção. E uma cepa viral *Adenovirus* selvagem 5 (ADWT), mostrou-se capaz de aumentar o consumo de glutamina e a atividade de glutaminase, sendo assim uma possível fonte para geração de aminoácidos e intermediários da via de hexosamina (FISHER; GINSBERG, 1957; THAI et al., 2015). A família *Herpesvirus*, também composta por vírus de DNA, foi demonstrada reprogramando o metabolismo celular de diferentes modos. Por exemplo, a cepa Herpes simplex vírus 1 (HSV-1), e Citomegalovírus humano (HCMV) ambos induzem aumento de da glicólise sendo que o HSV-1 induz aumento de intermediários que estão acima do fosfoenolpiruvato (PEP) e o HCMV induz a captação de glicose pela indução da translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (LANDINI, 1984; VASTAG et al., 2011; YU; MAGUIRE; ALWINE, 2011).

O vírus da dengue, um flavivírus, é capaz de modular a glicólise e os primeiros intermediários da via glicolítica, o que leva a um estado energeticamente favorável para replicação viral (FONTAINE et al., 2015). Em fibroblastos (Human foreskin fibroblasts), o DENV induziu aumento da expressão de translocadores de glicose GLUT1, aumentando também o a expressão de mRNA de genes de Hexokinase 2 (HK2) (FONTAINE et al., 2015). Em células de fibroblasto renais (BHK-21) e em células endoteliais (HUVEC-C) foi demonstrado que a atividade enzimática do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é aumentada durante a infecção pelo DENV de maneira dependente de NS1 (ALLONSO et al., 2015), porém

Silva e colaboradores demonstraram que a proteína NS3 do DENV interage diretamente com GAPDH, verificado ainda, co-localização da proteína NS3 e GAPDH em células Huh7.5.1 (célula hepática) infectadas com DENV2, BHK-21 transfectadas com plasmídeo contendo NS3 e em tecido hepático de um paciente com caso fatal de Dengue (SILVA et al., 2019), sugerindo que a interação das proteínas virais com as moléculas do hospedeiro podem influenciar diretamente alterações hepáticas.

A interação do GAPDH com NS3 viral reduz a atividade glicolítica levando ao acúmulo de metabólitos intermediários fazendo com o que vias metabólicas alternativas sejam então estabelecidas (SILVA et al., 2019). Em modelo *in vitro*, usando fibroblastos (ATCC PCS-201-010) foi demonstrado que durante a infecção por DENV os intermediários iniciais da via glicolítica como glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato aumentaram a sua concentração e os intermediários finais como 3-fosfoglicerato e fosfoenolpiruvato diminuíram no decorrer da infecção (FONTAINE et al., 2015). Porém, os autores não determinaram se essas modulações estavam relacionadas ao aumento do fluxo do metabolismo da glicose ou à diminuição da produção desses intermediários. Outro estudo demonstrou que quando utilizado phloretin, um inibidor do transporte de glicose em células vero e astroglioma U87MG, os títulos virais de DENV são reduzidos, seguidos da redução da atividade apoptótica de caspase 3 e 7 e redução da fosforilação de Akt/mTOR (LIN et al., 2019).

Em pacientes infectados com dengue no período inicial, na fase aguda da infecção, foi demonstrado que a intolerância à glicose está fortemente associada com a infecção, sendo um achado muito importante podendo ser um fator aliado para um diagnóstico precoce dessa infecção (MA et al., 2010).

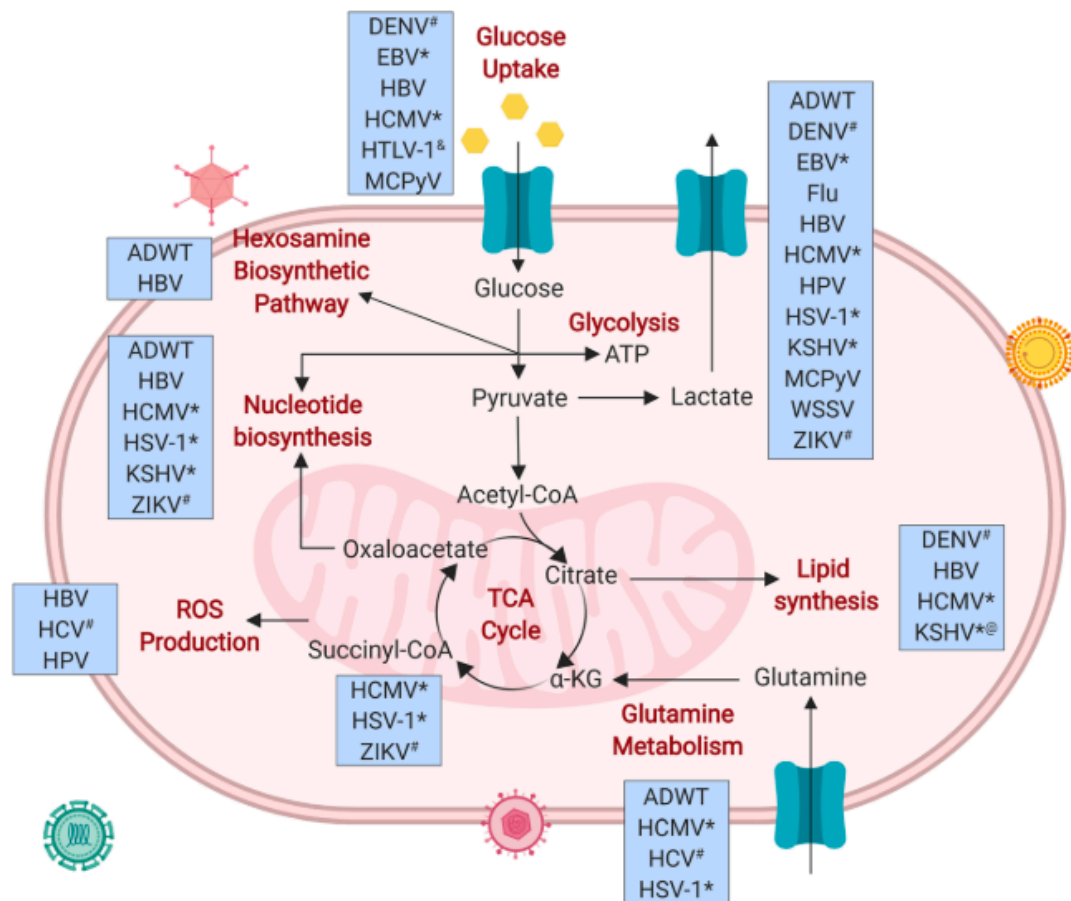


Figura 05. Vias metabólicas alteradas por vários tipos de vírus. * Vírus pertencentes a família de *Herpevirus*; # Vírus pertencentes a família de *Flavivírus*; & Regulação negativa promovida pela infecção; @ A cepa KSHV regula positivamente a síntese de lipídeos, porém regula negativamente a síntese de colesterol. Figura retirada de Thaker et al, *Viral hijacking of cellular metabolismo*, *BCM Biology* 2019.

1.6 Metabolismo energético e funções testiculares

A energia metabólica fornecida pela glicólise também é necessária para formação de espermatozoides e para a fertilização em roedores e humanos (FORD, 2006; WILLIAMS; FORD, 2001). Durante a espermatogênese, a utilização de alguns substratos é dependente do estágio celular do desenvolvimento (BAJPAI; GUPTA; SETTY, 1998). A dependência do lactato, por exemplo, está correlacionada aos estágios iniciais da espermatogênese, enquanto que os espermatozoides (células já maduras) usam glicose e outras hexoses como principais substratos para seu consumo energético, além da dependência da β -oxidação lipídica (AMARAL et al., 2013; BRAUCHI et al., 2004; DIAS et al., 2014). Em camundongos foi

demonstrado que as células germinativas, do início da espermatogênese, não são incapazes de metabolizar a glicose e seu desenvolvimento depende do lactato fornecido pelas células de Sertoli (BOUSSOUAR; BENAHMED, 2004; RATO et al., 2012). Porém as células de Sertoli não dependem da oxidação da glicose para suas necessidades energéticas. Essas células utilizam a β -oxidação como principal fonte para garantir a energia necessária para exercício das suas funções celulares. Enquanto que o piruvato proveniente de glicólise é, em sua maioria, direcionada para a formação de lactato, que por sua vez, garantirá substrato metabólico para células germinativas Figura 06) (OLIVEIRA et al., 2015; RATO et al., 2012).

Para o metabolismo testicular, as células de Sertoli apresentam um papel fundamental garantindo suporte físico e também nutritivo para as células germinativas (ALVES et al., 2013; BOUSSOUAR; BENAHMED, 2004; FIJAK; BHUSHAN; MEINHARDT, 2011; ZHENG et al., 2015) . Pelo seu papel fundamental na espermatogênese, em condições de privação de glicose, algumas vias são ativadas como garantia da manutenção energética para as células germinativas. A falta de glicose, então, vai induzir AMPK e a via p38 MAPK, que irão aumentar os níveis de RNAm para GLUT1 aumentando então a captação de glicose, o que levará também ao aumento dos níveis de mRNA para GLUT 3 e MCT1 (GALARDO et al., 2010; NGUYEN, 2017; RIERA et al., 2009).

Os transportadores de glicose desempenham um papel muito importante relacionados à regulação e dinâmica das hexoses no organismo. Porém, cada receptor possui uma dinâmica e característica diferente no organismo e na espermatogênese. O receptor GLUT 2 foi encontrado em testículo de camundongos e possui a capacidade de transportar também frutose (KOKK et al., 2004). O transportador de glucose GLUT 3 é o mais abundante no testículo, sendo que o GLUT 14, último a ser descoberto, tem como sua localização principalmente o testículo, esse receptor tem 95% de homologia com o GLUT3 (KOKK et al., 2004). Mesmo o GLUT3 sendo o mais abundante no testículo, no espermatozoide maduro há uma distribuição diferenciada de transportadores GLUT sendo que GLUT1 e GLUT2 estão mais localizados na região do acrossoma e na cauda, enquanto que o GLUT 3 é mais encontrado na peça intermediária do espermatozoide (BUCCI et al., 2011; DING et al., 2015). Após a passagem da glicose pelos transportadores GLUT, ela é catalisada pela enzima hexoquinase, a primeira enzima da via glicolítica. A hexoquinase catalisa a conversão de hexose (glicose) em hexose-6-fosfato, quatro isoformas de hexoquinase são expressas em células de mamíferos sendo que a hexoquinase (HK1) é a mais expressa em testículo de camundongos (NAKAMURA et al., 2008).

Diferentemente das outras proteínas da via glicolítica citadas acima a fosfoglicerato quinase (PGK), a enzima responsável pela primeira etapa geradora de ATP na via da glicólise,

esta sendo considerada como um dos possíveis biomarcadores de fertilidade (BIENIEK; DRABOVICH; LO, 2016; DANSHINA et al., 2010; KOVAC; PASTUSZAK; J., 2013). A proteína PGK2, encontrada apenas no tecido reprodutivo, não desempenha um papel crucial para o desenvolvimento de espermatozoides no processo de espermatogênese, mas é essencial para a motilidade dos espermatozoides e fertilidade masculina (LIU et al., 2016; PARKA et al., 2018). Isto sugere que a PGK2 desempenha um duplo papel, no metabolismo energético e na fertilidade masculina (LIU et al., 2019). A fosfoglicerato quinase possui duas isoformas em mamíferos a PGK1 e a PGK2, sendo que a PGK1 possui um papel muito importante para câncer sendo considerado um fator de prognóstico (SUN et al., 2015). A proteína PGK1 é também encontrada no testículo e em espermatozoides maduros, contudo, durante a espermatogênese a transcrição de PGK1 é reprimida em espermatócitos devido à inativação do cromossomo sexual meiótico, enquanto é iniciada a expressão compensatória de PGK2 principalmente em espermatócitos e espermátides (LIU et al., 2016; MCCARREY et al., 1992).

Outra enzima que apresenta uma função muito importante para a fertilidade e está presente no metabolismo da glicose é a Enolase. A expressão da Enolase está mais identificada na cauda de espermatozoides maduros associadas aos microtúbulos, sugerindo um papel fundamental para motilidade (GITLITS et al., 2000). Ademais, a Enolase possui algumas isoenzimas em mamíferos sendo que a Enolase 4 apresenta um papel fundamental para a organização estrutural da cauda dos espermatozoides e desempenha a maior função das enolases em espermatozoides (NAKAMURA et al., 2013).

No entanto, não há evidência publicada ligando a infecção pelo ZIKV a uma alteração no metabolismo celular da glicose, modulação de PGK2 e estabelecimento viral no testículo.

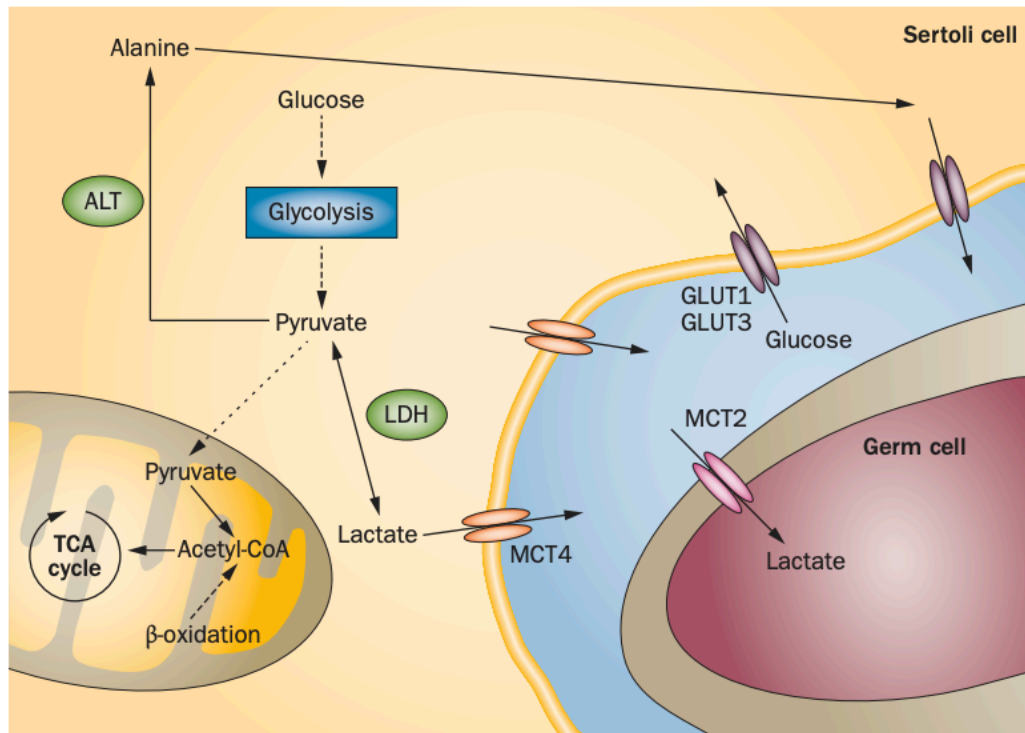


Figura 06. Células de Sertoli metabolizam glicose para conversão em lactato. O lactato metabolizado pelas Células de Sertoli é utilizado como principal fonte energética das células germinativas. Figura retirada de: Rato, L. *et al.* Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat. Rev. Urol.* **9**, 330–338 (2012).

2. Justificativa

O ZIKV é o primeiro flavivírus conhecido por ser transmitido via sexual em humanos. Esse fator eleva os riscos epidemiológicos associados à infecção por ZIKV, devido à suscetibilidade de novas rotas de disseminação viral. Em camundongos, o ZIKV pode infectar tipos celulares distintos encontrados no trato reprodutivo masculino, como espermatogônias, espermatócitos primários e células de Sertoli. As células de Sertoli podem suportar altos níveis de replicação do ZIKV, enquanto a infecção das espermatogônias pode promover a morte celular, levando à destruição dos túbulos seminíferos. A infecção por ZIKV também pode reprogramar a transcrição global de micróglia humana, fibroblastos, macrófagos e linhas celulares de rim embrionário humano. Sabe-se também que a infecção pelo ZIKV reprograma o metabolismo celular modulando a produção de energia da glicólise em células-tronco mesenquimais humanas. Vários trabalhos sugerem que a modulação do metabolismo celular, incluindo a glicólise, leva a distúrbios neurológicos, defeitos congênitos e malformação cerebral. Semelhante ao cérebro, os testículos são um órgão de privilégio imunológico que são afetados pela infecção pelo ZIKV. A infecção por ZIKV pode induzir inflamação, estimulando a resposta imune inata, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em células testiculares de camundongos. Apesar de todo esse conhecimento, mais estudos são necessários para elucidar o (s) mecanismo (s) molecular (es) dentro do testículo que são afetados pela infecção do ZIKV. Para melhor compreender a replicação do ZIKV dentro do trato reprodutivo masculino e o impacto na fertilidade masculina buscamos identificar a modulação de metabolitos pela infecção com enfoque na via glicolítica. A fosfoglicerato quinase 2 (PGK2), enzima responsável pela primeira etapa geradora de ATP na via da glicólise, é expressa apenas no testículo e considerada por alguns como um biomarcador de fertilidade, devido, o seu papel na motilidade dos espermatozoides pode ser de grande impacto para o entendimento da patogênese viral nos testículos. Compreender os mecanismos associados à infecção por ZIKV pode ser uma chave para o desenvolvimento de novos tratamentos. A influência da infecção pelo ZIKV no metabolismo energético celular pode ser uma ferramenta promissora e diferencial no estudo da fertilidade masculina. Além disso, a avaliação da modulação do PGK2 pode ser um alvo importante, devido ao duplo papel dessa proteína na fertilidade e no metabolismo energético.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar o impacto da infecção por duas diferentes cepas do ZIKV no metabolismo energético do testículo e fertilidade masculina

3.2. Objetivos Específicos

- a) Identificar e comparar as variações/mutações existentes no genoma de duas diferentes cepas do ZIKV (a cepa brasileira ZIKV BR e a cepa porto-riquenha ZIKV PO);
- b) Investigar a patogênese promovida pelos isolados ZIK BR e ZIKV PO em animais imunocomprometidos e imunocompetentes.
- c) Investigar o efeito da infecção por ZIKV BR e ZIKV PO sobre testículos de animais imunocomprometidos e imunocompetentes;
- d) Avaliar o perfil espermático como concentração e motilidade de espermatozoides de animais imunocompetentes infectados com o isolado ZIKV BR;
- e) Analisar o perfil inflamatório dos testículos imunocompetentes infectados com o isolado ZIKV BR;
- f) Caracterizar a modulação do perfil global de metabólitos em testículo de animais imunocompetentes induzida pela infecção por ZIKV BR;
- g) Avaliar a expressão de genes relacionados com a via glicolítica em testículos de animais imunocomprometidos e imunocompetentes provocados pela infecção com ZIKV BR e ZIKV PO;
- h) Avaliar os efeitos da infecção por ZIKV PO no testículo de animais imunocomprometidos após um período de infecção mais tardio;
- i) Avaliar as modificações físico-químicas e morfológicas de amostras de sêmen humano obtidas de indivíduos previamente infectados com ZIKV e saudáveis;
- j) Verificar o perfil proteômico do sêmen de homens infectados com ZIKV;

4. Metodologia

4.1 Análises *in vitro*

4.1.1 Linhagens celulares utilizadas

* VERO: Linhagem de células derivadas de tecido epitelial do rim de macaco (*Cercopithecus aethiops*). Foram cultivadas com meio DMEM suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótico- antimicótico em estufa úmida a 37 °C a 5% CO₂.

*BHK-21: Células derivadas de fibroblastos do rim de hamster (*Mesocricetus auratus*). Foram cultivadas com meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de solução antibiótico- antimicótico em estufa úmida a 37 °C a 5% CO₂.

*C6/36: Células da larva de mosquito (*Aedes albopictus*). Foram cultivadas em meio TC100 suplementado com 10% SFB e incubados em uma estufa a 37 °C sem a presença de CO₂.

4.1.2 Expansão do ZIKV

A cepa viral do ZIKV brasileira foi denominada ZIKV BR (ZIKV/Homo sapiens/PE243/2015, GenBank: KX197192.1) utilizado nesse trabalho foi isolada no Brasil, do soro de um paciente em fase aguda no estado do Pernambuco durante o período do surto que ocorreu na região em 2015. Inicialmente o vírus foi propagado uma vez em células C6/36 e mais duas vezes em células VERO. A cepa viral porto-riquenha do ZIKV foi denominada ZIKV PO (ZIKV/Homo sapiens/PRI/PRVABC59/2015, GenBank: KX087101.2) e foi isolada em Porto Rico durante o surto de 2015.

Para a propagação viral a confluência das células a serem infectadas estava em cerca de 70% e um dia antes da infecção a concentração de SFB no meio de cultura foi reduzida para 2%. Uma alíquota de dos vírus foram utilizadas para infectar as células, e passados seis dias após a infecção ou a percepção do efeito citopático, o meio de cultura foi coletado e centrifugado a 4°C a 300g (1800 rpm) durante 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado e em seringas com filtros de 22 µm e posteriormente ultracentrifugado com rotação de 24000rpm por 3horas a 4°C seguido do congelado gerando o estoque viral.

4.1.3 Titulação do ZIKV

Para a titulação viral foram utilizadas as células BHK-21, estas foram plaqueadas, 10^5 células por poço em placas de 24 poços com meio de cultura com 2% SFB. Para realizar a infecção das placas foram feitas 10 diluições virais. Após o período de 2 horas de infecção o sobrenadante foi descartado e o meio semissólido (DMEM + SFB 2% + 2,9 % Carboximetilcelulose (CMC) foi adicionado nos poços e a placa incubadas a 37°C durante o período de 6 dias, em seguida o meio semissólido foi retirado e adicionado o fixador formalina, para a fixação das células que foram incubadas overnight na geladeira a 4°C. Após a fixação foi adicionado o corante Cristal violeta pelo período de 3h para fazer a coloração das células, então a placa é lavada em água destilada, após a secagem é feita a contagem dos spots. Para o cálculo da titulação viral é feita a contagem dos spots resultantes dos poços em triplicata e feita à média aritmética entre eles, após a média ser feita esta é inserida na fórmula: $P \times F \times 10 \times \text{PFU/ml}$ onde P é a média do número de placas F é o fator de correção para expressar o título de PFU/ml ($1000\mu\text{L}/\text{volume do inoculo}$) e 10x diluições que as unidades de placas foram formadas.

4.1.4 Análises de bioinformática

As sequências utilizadas para comparação dos genomas foram as das cepas ZIKV BR e ZIKV PO, código de acesso gene bank KX197192 e KX087101, respectivamente. As sequências foram alinhadas utilizando ClustaW (LARKIN et al., 2007). As diferenças encontradas na proteína NS1 foram mapeadas na estrutura cristalográfica da NS1 da cepa ZIKV PO (código de acesso do PDB 5GS6) e na NS1 modelada da cepa ZIKV BR (modelo estrutural gerado por homologia no programa Modeller (ESWAR et al., 2006). O programa VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) foi utilizado para a visualização das estruturas

4.1.5 Análise filogenética da mutação Y122H na NS1

Foram utilizadas 19 sequências de genoma completo de Zika vírus (ver tabela 01 para detalhes), incluindo aqueles utilizados na parte experimental. Um alinhamento das sequências de aminoácidos das respectivas poliproteínas foi construído utilizando o ClustaW. A árvore filogenética foi feita utilizando o método Neighbor Joining. Ambas etapas foram realizadas no software Geneious®.

Código de Acesso	Localidade	Ano de coleta
KX197192	Brasil	2015
KY559004	Brasil	2016
KX811222	Brasil: Fortaleza	14/jun/16
	Brasil: Manaus,	
MK216713	Amazonas	08/jan/16
KY558999	Brasil	2016
KY559024	Brasil	2016
MF352141	Brasil: Pernambuco	13/06/2015
KY559005	Brasil	2016
KY559006	Brasil	2016
KY559011	Brasil	2016
KY785479	BRA	2016
NC_035889	Brasil: Natal	2015
MH513599	H366	2015
KU955593	Camboja	2010
KX087101	Puerto Rico	2015
MH675620	Puerto Rico	mai/16
MH675623	Puerto Rico	jun/16
MH675627	Puerto Rico	ago/16
MK028857	Puerto Rico	2015

Tabela 01. Relação dos genomas utilizados na reconstrução filogenética. Os genomas utilizados nos ensaios experimentais de bancada estão destacados em negrito

4.2 Análises *in vivo*

4.2.1 Comitê de Ética animal

No experimento com animais foram realizadas na instalação de criação de animais do Centro de Pesquisa da CHU de Québec - Université Laval. Todos os animais foram utilizados de acordo com as diretrizes do Conselho Canadense de Cuidados com Animais, e todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Cuidados com Animais da Université Laval sob os protocolos nos. 2016011 e 2017054, bem como pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade de Brasília (em anexo).

4.2.2 Infecções *in vivo*

Utilizamos camundongos da linhagem C57/BL6 (imunocompetentes), IFNAR^{-/-} (imunocomprometidos) quais foram mantidos na instalação de criação de animais do Centro de Pesquisa da CHU de Québec - Université Laval com água e alimento ad libitum. Os

camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^6 PFU/ml de ZIKV BR e ZIKV PO intravenoso com a idade de 6-8 semanas. Os camundongos IFNAR^{-/-} foram infectados por via subcutânea com 150ul de ZIKV BR e ZIKV PO em cada perna, com dose total de 6×10^5 PFU/ml. Os camundongos C57BL/6 foram anestesiados e tiveram o sangue coletado por via ocular, nos dias 2,7 e 14 da infecção. A cada 2 dias os animais IFNAR^{-/-} infectados com ZIKV PO foram anestesiados e tiveram o sangue coletado por via ocular, sendo feita a coleta nos dias 2,4,6,8,10,14,21 e 28. Como os dias de coleta eram próximos, os camundongos foram divididos em dois grupos de igual número, que foram sangrados alternadamente a cada dois dias. Metade dos animais IFNAR^{-/-} infectados com ZIKV PO foram sacrificados no dia 14 após a infecção para coletar epidídimos e testículos, enquanto os demais animais foram utilizados para avaliação da infecção na crônica do ZIKV. Para experimentos de longo prazo de infecção foi utilizado animais IFNAR^{-/-} infectados com a cepa viral ZIKV PO e após 183 dias de infecção ocorreu o sacrifício e análise do trato reprodutor dos animais. Todas as eutanásias ocorreram em câmara de CO₂.

4.2.3 Determinação da carga viral pela reação em cadeia da polimerase - PCR digital em gotas (ddPCR)

Para o soro, o RNA foi extraído de 70 µl de amostra com o kit de isolamento de ácido nucleico total MagNA Pure LC (Roche Molecular System, Laval, Quebec, Canadá) eluído em 100 µl. Algumas amostras foram ajustadas para 70 µl com H₂O estéril e o fator de diluição foi levado em consideração. O testículo direito foi pesado e homogeneizado usando o homogeneizador OMNI International TH (OMNI International, Ottawa, Ontário, Canadá) em um tubo Falcon de 15 ml contendo 1 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) com protease (Completo, Mini, Inibidor de Protease sem EDTA Cocktail, Inibidores de Roche). As amostras homogeneizadas foram centrifugadas durante 10 minutos a 1455x g a 4°C. A extração de RNA foi realizada em 200 µl de sobrenadante com o mesmo kit de isolamento e protocolo, mas a eluição foi feita em 50 µl de tampão de eluição. O fluxo de trabalho da PCR digital (ddPCR) e as análises de dados foram realizados com o One-Step RT-ddPCR Advanced Supermix, de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 20 µl da mistura da reação foram utilizados para produzir gotículas com o gerador de gotículas QX200 (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canadá). Primers e sondas (ou seja, ZIKV 1086 [1086-1102], 5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3'; ZIKV 1162c [1162-1139], 5'-CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3'; ZIKV 1107-FAM [1107-1137], 5' -6 FAM /

AGCCTAC CTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA / ZEN-3'IBFQ-3 ') visando os genes de membrana e envelope do ZIKV previamente descritos. O ddPCR permite a quantificação absoluta de ácidos nucleicos sem a necessidade de uma curva padrão. As amostras particionadas em gotas foram então transferidas para uma placa de 96 poços, seladas e cicladas em um termociclador C1000 (Bio-Rad) sob o seguinte protocolo de ciclagem: 5 °C por 60 minutos (transcrição reversa) e 95°C por 10 minutos (ativação da DNA polimerase), seguido por 45 ciclos de 95°C por 30 segundos e 56°C por 1 minuto, seguido por etapas de pós-ciclismo de 98°C por 10 minutos (inativação enzimática) e um infinito 10°C segure. A placa ciclada foi então transferida e lida no canal FAM usando o leitor de gotas QX200 (Bio-Rad), e a análise de dados foi realizada usando o software QuantaSoft (versão 1.7.4; Bio-Rad).

4.2.4 Dosagem Glicêmica do sangue dos animais

O nível de glicose sanguíneo foi mensurado após 14 dias de infecção dos animais. Após um período de 8 horas de jejum foi coletada amostra de sangue dos camundongos e a leitura da glicose por um glicosímetro Accu-check da marca Roche.

4.2.5 Extração de proteína e Western Blot do homogeneizado de testículo

O testículo direito dos animais foi pesado e homogeneizado e as amostras homogeneizadas foram centrifugadas durante 10 minutos a 1455x g a 4°C, o sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente para a extração das proteínas. A concentração de proteínas solúveis foi determinada usando kit DC™ Protein Assay (BioRad). 30ug por poço foram separadas em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) um gel foi transferido para membrana de PVDF ou gel corado com Coomassie Blue. As membranas foram bloqueadas com a solução: 5% leite desnatado em TBS contendo 0,05% tween 20. Após 1 hora de bloqueio os anticorpos primários com as concentrações utilizadas sendo as recomendadas pelo fabricante (GLUT2- abcam ab54460, GLUT3, abcam-ab191071, Hexoquinase I abcam-ab150423, PGK2- abcam-ab183031, PGK1-abcam-ab199438, β -actina abcam- ab8227). Subsequentemente, as membranas foram lavadas e tratadas com o anticorpo secundário Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) -ab205718. As membranas foram então tratadas com o kit de detecção Clarity™ Western ECL Substrate (Biorad). Os resultados foram obtidos como a razão densitométrica da proteína de interesse/beta-actina usando o software ImageJ. As densidades relativas das bandas foram determinadas através de análise de densitometria, utilizando o programa ImageJ. Os resultados foram expressos como a razão entre a quantidade de proteína de interesse pela quantidade de

proteína constitutiva beta-actina Os valores das densidades foram corrigidos pela subtração dos valores do “background”. Os resultados obtidos foram comparados aos controles que foram considerados como 1.

4.2.6 Dosagem de citocinas do testículo de animais

Testículo dos não animais infectados e infectados com as cepas virais ZIKV BR e ZIKV PO foram macerados a 4°C imediatamente após a eutanásia com solução de inibidor de protease na proporção 1:20. As citocinas provenientes do testículo foram mensuradas utilizando kits comerciais (eBioscience e R&D System). As concentrações de citocinas nas amostras foram calculadas baseadas em uma curva padrão e os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL). Todo o ensaio foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante para dosagem de IL-1 β , TNF- α , TGF- β , IL-10 e IL-6. A absorbância foi detectada no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA).

4.2.7 Análise da concentração de ATP

Testículo de animais imunocompetentes, não infectados e infectados com ZIKV BR foram macerados e tiveram a extração de ATP segundo o protocolo descrito por Chida (CHIDA; KIDO, 2014) para extração de ATP para tecidos. Para a quantificação foi utilizado um kit de bioluminescência da Molecular Probes® denominado ATP Determination Kit com o número do catálogo A22066. O ensaio é baseado em uma reação da emissão de luz proveniente da oxidação da molécula de ATP pelo complexo luciferina/luciferase (emissão máxima ~ 560 nm a pH 7,8) e o ensaio foi lido no foi no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA).

4.2.8 Análise metabólica dos testículos

Todos os produtos químicos eram de grau HPLC. Acetonitrilo (A955-4L) e ácido fórmico (A117-50); A água ultrapura foi produzida por SuperQ Millipore um sistema para fase móvel e diluição de reagente.

As extrações liofilizadas foram ressuspensas em 200 μ l de fase móvel 95: 5 fases A (MPA) e solução móvel da fase B (MPB), sonificado 5 min e filtrado por uma seringa de membrana 0.22 μ M (Canadian Life Science, parte n CNY6502). Um pool de controle de qualidade foi preparado para a validação do lote, adicionando 10 μ l de cada amostra.

Cromatografia líquida foi realizada em um sistema de bomba binária Acquity UPLC I-Class. O MPA consistia em 0,1% ácido fórmico em água e MPB consistiram em 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. A coluna utilizada foi um BEH C18 1,7 μ M x 1,0 mm por 100 mm (Waters Corporation, parte no.186002346) a 40°C. Uma pré-coluna VanGuard com unidade de filtragem de 2,1 x 5 mm (Waters Corporation, parte nº 205000343) foi usada para proteger a coluna analítica de impurezas. As condições do gradiente foram: 0 a 6 min = 1 a 60% B; 6,01 a 8,00 min = 60 a 96% de B; 8,01 a 9,00 min = 96% de B; 9,01 a 11,00 min = 1% B. O volume de injeção foi de 2,0 μ l e a taxa de fluxo foi de 0,1 mL / min. A metabolômica foi realizada em um Synapt G2-Si equipado com uma fonte de ionização por ESI em modo negativo. Condições de origem e parâmetros MS, respectivamente: tensão capilar 3.0kV (ESI +); 2,5 kV (ESI-), temperatura da fonte 120 °C, dessolvatação temperatura 350 °C e gás de dessolvatação 900 (ESI +); 700 (ESI) L * min⁻¹. Ambos MS e Os espectros MS / MS foram digitalizados com ou sem uma rampa de energia de colisão de 15 a 35V. A análise estatística foi realizada utilizando o software Progenesis QI e identificação de pico foi feito usando os bancos de dados KEGG e BioCyc.

4.2.9 Análise de qRT-PCR

Após a homogeneização dos testículos (como descrito acima). Foi realizada a extração de RNA total com o RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). RNA total foi quantificado por utilizando Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) e sua integridade foi avaliada por gel de agarose. A concentração de 1 μ g de RNA de cada amostra foi transcrita reversamente em cDNA em uma reação de volume final de 20 μ l como recomendado pelo fabricante (Invitrogen-SuperScript® III Reverse Transcriptase). As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer). Amplificação em tempo real foi realizada no ABI 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando-se SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) 40 ng de cDNA foram utilizados na reação com os iniciadores. As sequências dos iniciadores são descritas na Tabela 1. Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. O protocolo de dissociação foi realizado no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. As reações de PCR foram realizadas em triplicatas. A expressão gênica de β -actina foi utilizada como controle endógeno da reação. A quantificação relativa das expressões de cada gene normalizado pelo controle endógeno foi calculada utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta}$.

4.2.10 Coleta e análise dos espermatozoides

O epidídimo dos animais não infectados e infectados com ZIKV BR foi coletado e imediatamente adicionados a uma placa de petri contendo solução salina sobre uma placa térmica a 37°C, ao qual os espermatozoides foram coletados a partir do flush epididimal. A mobilidade espermática foi avaliada por meio de identificação de espermatozoides móveis em microscopia de luz. A concentração espermática foi realizada por meio da diluição do lavado epididimal em fixador paraformaldeído e depois realizada a contagem em câmara de Neubauer.

As análises a seguir foram realizadas nos animais que ficaram infectados com longo período de infecção:

4.2.11 Proteômica a partir de Gel de Poliacrilamida

Proteínas foram extraídas a partir de homogeneizado de testículo de camundongos IFNAR^{-/-} infectados com ZIKV PO. 30ug de proteína de cada amostra foram submetidas a eletroforese. O gel foi incubado com 0,5% de *Coomassie Blue* G-250 preparados em 50% de metanol e 10% de ácido acético durante 10 minutos. A banda de interesse, na altura de cerca de 60 kda foi cortada com bisturi, transferida para um tubo eppendorf contendo água ultrapura a fim de descolorar o gel. O gel passou pela digestão com tripsina.

4.2.12 Digestão

A digestão, análise de proteínas e espectrometria de massa foram realizadas pela Plataforma de Proteômica do Centro de Pesquisa CHU de Québec (Quebec, Qc, Canadá), as proteínas foram reduzidas com DTT 10 mM e alquiladas com iodoacetamida 55 mM. A digestão com tripsina foi realizada utilizando 126 nM de tripsina de porco modificada (Grau de sequenciamento, Promega, Madison, WI) a 37 ° C durante 18 h. Os produtos de digestão foram extraídos usando ácido fórmico a 1%, acetonitrila a 2% seguido por ácido fórmico a 1%, acetonitrila a 50%. Os extratos recuperados foram reunidos, secos com centrífuga sob vácuo e depois ressuspensos em 12 ul de ácido fórmico a 0,1% e 5 ul foram analisados por espectrometria de massa.

4.2.13 Espectrometria de massa

As amostras de peptídeos foram separadas por cromatografia líquida capilar em nanoescala de fase reversa e analisadas por espectrometria de massa por eletrospray (ES MS / MS). Os experimentos foram realizados com um Ekspert NanoLC425 (Eksigent) acoplado a um espectrômetro de massa 5600+ (Sciex, Framingham, MA, EUA) equipado com uma fonte de nanoelectrospray. A separação dos peptídeos ocorreu numa coluna de picofit de empacotamento automático (New Objective) com o repositil 3u, 120A C18, 15 cm x 0,075 mm de diâmetro interno, (Dr. Maisch). Os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de 5-35% de solvente B (Acetonitrila, 0,1% de ácido fórmico) em 35 minutos, a 300 nl / min. Os espectros de massa foram adquiridos usando um modo de aquisição dependente de dados usando o software Analyst versão 1.7. Cada espectro de massa de varredura completa (400 a 1250 m / z) foi seguido por dissociação induzida por colisão dos vinte íons mais intensos. A exclusão dinâmica foi definida por um período de 12 segundos e uma tolerância de 100 ppm. A quantificação ocorreu por íon extraído, FDR 1%.

4.2.14 Pesquisa no banco de dados

Arquivos com lista de picos MGF foram criados usando o software Protein Pilot versão 4.5 (Sciex). Os arquivos de amostra de MGF foram então analisados usando Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido; versão 2.5.1). Scaffold (versão Scaffold_4.7.1, Proteome Software Inc., Portland, OR) foi utilizado para validar identificações de peptídeos e proteínas baseadas em MS / MS.

4.3 Análises em amostras humanas de sangue e sêmen

4.3.1 Comitê de Ética humano

As amostras de pacientes homens infectados e saudáveis foram triadas pelo neurologista Dr. Carlos Tauil, do Hospital de Base, sob comitê de ética CAAE número 18403013.4.0000.5553. Foram utilizadas amostras de doadores voluntários saudáveis que foram processadas no Laboratório de Imunologia e Inflamação da Universidade de Brasília-UnB. As amostras foram aliqüotadas, identificadas com um código próprio e armazenadas em freezer -80°C. Os pacientes tiveram o soro coletado e processado utilizando o protocolo de Ficol-Hypaque (BÖYUM, 1968). Os pacientes apresentaram-se voluntariamente para participar do estudo, se disponibilizaram mediante assinatura de termo de consentimento livre e

esclarecido. Os pacientes no estudo passaram por critérios de exclusão em que pacientes com comorbidades pré-existentes como obesidade, diabetes ou doenças inflamatórias; idade superior a 40 anos; acometimento de outra flavivirose em menos de 2 anos; uso de remédios controlados foram excluídos das análises. O sêmen coletado foi analisado conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). Todos os pacientes do estudo informaram que não haviam nenhuma virose associada, além de nenhuma queixa de infertilidade. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até as análises. Dados dos pacientes podem ser identificados na tabela a seguir:

Diagnóstico	Idade	Localidade	Filhos	Altura	Peso	IMC		TS
Controle	23	Asa Norte	0	1,8	61,8	17,17	Magreza	NA
Controle	23	Águas Claras	0	1,92	76	19,79	Normal	NA
Controle	24	Logo Norte	0	1,67	90	26,95	Sobrepeso	NA
Controle	24	Riacho Fundo	0	1,8	73	20,28	Normal	NA
Zika	35	Guará II	1	1,74	86	24,71	Normal	2 anos
Zika	39	Guará II	0	1,73	88	25,43	Sobrepeso	2,5 anos
Zika	39	Taguatinga	0	1,75	82	23,43	Normal	2 anos
Zika	23	Asa Norte	0	1,72	61	17,73	Magreza	2 anos

Tabela 02: Dados gerais dos pacientes que fizeram a doação de sêmen. NA: Não se aplica; TS: Tempo de Sintomas.

4.3.2 Proteômica de amostras de sêmen

A digestão, análise de proteínas e espectrometria de massa foram realizadas pela Plataforma de Proteômica do Centro de Pesquisa CHU de Québec (Quebec, Qc, Canadá).

4.3.3 Extração de proteínas

Proteínas foram extraídas por maceração à temperatura de 4°C com o tampão de extração contendo:

	Concentração Final
DOC (Detergent deoxycholate)	0,5%(300ul)
ABC (Ammonium bicarbonate)	50mM(150ul)
DTT (Ditiotreitol)	50mM (150ul)
Inibidor de protease	1X (300ul)
Pepstatina	1uM (6ul)
H ₂ O HPLC	2100ul

Após a extração as proteínas foram ressuspensas em tampão ABC50mM / DOC1%. Proteínas foram quantificadas por Bradford para prosseguir com a digestão de 10ug por amostra para digestão.

A digestão com tripsina foi realizada utilizando 0,2ug de tripsina (razão tripsina: proteína 1:50) a 37°C durante 18 h. A purificação das proteínas foi feita utilizando The stop-and-go-extraction tips (StageTips). Os peptídeos foram então injetados em um sistema de cromatografia Dionex UltimatenanoRSLC (Thermo FisherScientific / Dionex Softron GmbH, Germering, Alemanha) conectados a um espectrômetro de massa Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific, San Jose, Calif., EUA) 50 cm 75 u, de coluna de fase invertida feita de ReproSil-Pur C18- Resina AQ 3-µm (Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen, Alemanha), por 120 min. Os espectros de massa de varredura completa (350 a 1800m / z) foram adquiridos no orbitrap, seguido de fragmentação dos íons mais intensos no HCD com detecção na armadilha linear. Arquivos de espectro foram pesquisados com o Mascot e o detector de recursos Minora do Proteome Discoverer 2.3.0.523 (ThermoFisher). Cisteínas foram especificadas como carbamidometiladas oxidação de metionina, e desamidação de Asparagina e glutamina foram determinadas como modificações variáveis. No modo *Label-free*, cada amostra foi analisada em aquisições LC-MS/MS individuais e a abundância dos peptídeos foram alinhadas entre as diferentes corridas para considerar as discrepâncias cromatográficas do tempo de retenção.

4.3.4 Análise das características dos espermatozoides humanos

A fim de investigar os efeitos da infecção por ZIKV nos espermatozoides humanos, pacientes voluntários tiveram amostra de esperma coletadas. Pacientes infectados e controle tiveram diagnóstico da infecção por ZIKA por meio de RT-PCR. A coleta do material seguiu o protocolo recomendado pela Organização Mundial de Saúde, com os pacientes em abstinência

por 2-7 dias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). As amostras foram submetidas ao espermograma, realizado nos laboratórios Sabin de Brasília. O exame é capaz de averiguar as características dos espermatozoides e constatar dados sobre a capacidade reprodutiva masculina. O exame é dividido na: (1) avaliação da qualidade físico-química do sêmen, que consiste no volume ejaculado, pH, cor, viscosidade, aspecto, tempo de liquefação e presença de coágulo seminal após a ejaculação; (2) avaliação microscópica do sêmen, que consiste na concentração de espermatozoides por ml, no número de espermatozoides por volume ejaculado e na presença ou ausência de aglutinação de espermatozoides; (3) análise de motilidade, que consiste na motilidade progressiva, motilidade não progressiva e imóveis; e (4) análise morfológicas, que consiste na normalidade e anormalidades dos espermatozoides.

4.3.5 Análise estatística

Os dados foram representados graficamente e analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0. As análises foram feitas inicialmente pela verificação da normalidade das amostras quanto a distribuição pelo teste de Person e teste Kolmogorov–Smirnov. Significância estatística foi calculada utilizando teste Mann Whitney para amostras não paramétricas. Para amostras com múltiplas variáveis foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$. As amostras de análises múltiplas tiveram correção pelo teste de Bonferroni. Além do mais, todas as mostras foram testadas para verificação de outlier.

5. Resultados

5.1. Os isolados ZIKV BR e ZIKV PO apresentam diferenças genômicas

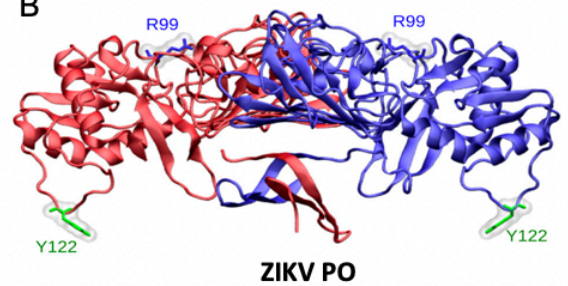
Com o objetivo de identificar diferenças genéticas de duas cepas circulantes no mesmo surto epidêmico, comparamos os genomas das cepas ZIKV BR (KX197192) e ZIKV PO (KX087101).

O alinhamento das sequências nucleotídicas revelou 39 mutações diferenciais entre as cepas na região codificadora da poliproteína que resultam em 9 substituições de aminoácidos, conforme pode ser observado na tabela abaixo (Figura 7 A). Durante as análises verificamos uma mutação no sítio 122 da proteína NS1 das duas cepas de ZIKV. Sabe-se que o sítio 122 da proteína NS1 é de extrema importância para a infecção pelo ZIKV, uma vez que encontra-se em um loop que costuma conter aminoácidos hidrofóbicos que permitem a interação viral com a superfície da membrana do hospedeiro (HILGENFELD, 2016; HILGENFELD; VASUDEVAN, 2018). Durante as análises identificamos que no isolado ZIKV PO, o sítio 122 da proteína NS1 contém uma Tirosina (Y), que é um aminoácido polar neutro. Porém, a cepa ZIKV BR possui no resíduo 122 uma histidina (H) que é aminoácido polar básico (Figura 7 B e C). Decidimos avaliar se a mutação no resíduo 122 era mais recente no ZIKV BR ou ZIKV PO, com isso avaliamos 19 sequências de genomas completos de ZIKV e avaliamos a proteína NS1, especificamente, o resíduo 122 e verificamos que a Tirosina é mais conservada entre as cepas do que a Histidina, indicando que esse resíduo 122 na cepa ZIKV BR é mais recente que do que cepa ZIKV PO (Figura 7 D).

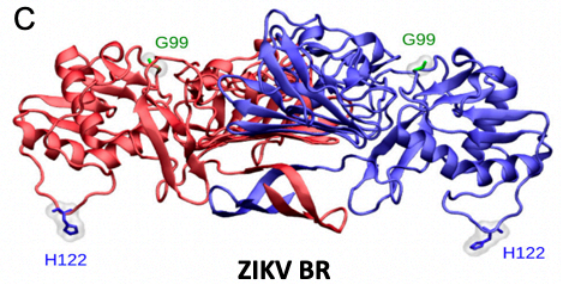
A

Gene	Number	Substitution
Capsid	1	T80I
Pro-peptide	0	-
Membrane pep.	0	-
Envelope pel.	2	V20I, L330V
NS1	2	R99G, Y122H
NS2A	0	-
NS2B	0	-
NS3	1	H355Y
NS4A	0	-
2K peptide	0	-
NS4B	2	I26M, I176M
NS5	1	V91A

B



C



D

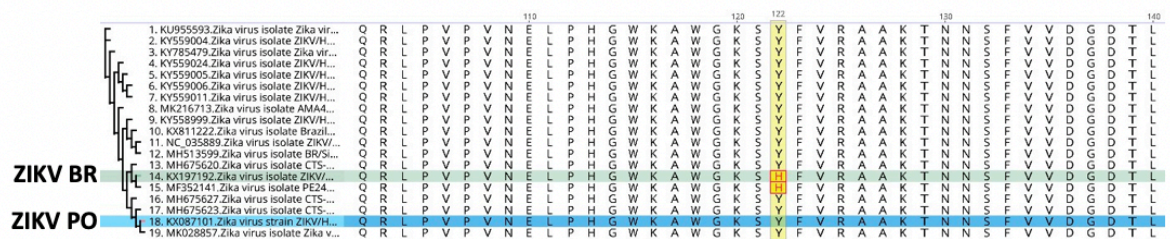


Figura 07. Resultado do alinhamento das sequências nucleotídicas das cepas ZIKV BR (KX197192) e ZIKV PO (KX087101). Tabela ressalta as mutações encontradas quando comparadas as duas cepas virais, sendo o primeiro aminoácido descrito na tabela pertencente ao ZIKV PO e o segundo ZIKV BR (A). Modelo da proteína NS1 da cepa ZIKV PO (B) e da cepa ZIKV BR (C). Análise filogenética da mutação Y122H na NS1 (D).

5.2 ZIKV BR apresenta um maior tropismo para o testículo em comparação com o ZIKV PO

Considerando as diferenças encontradas no resíduo 122 da proteína NS1 das cepas ZIKV BR e ZIKV PO, fomos verificar se haveria diferenças na patogênese sobre o testículo durante a infecção com as duas cepas de ZIKV em diferentes modelos de camundongos. Utilizamos modelo de animais imunocompetentes (C57BL/6) e imunocomprometidos (IFNAR^{-/-})

Para identificar o impacto do ZIKV na saúde testicular e identificar a virulência das cepas em circulação nas américas, nós comparamos os efeitos da infecção no testículo com ZIKV BR e ZIKV PO em animais imunocomprometidos e animais imunocompetentes. Anterior aos 14 dias de infecção verificamos que um animal imunocomprometido infectado com ZIKV BR morreu devido à infecção, indicando maior letalidade dessa cepa do que a cepa ZIKV PO.

Foi verificado que os animais imunocompetentes não encontradas diferenças significativas quanto ao ganho ou perda de peso durante a infecção (Figura 8A, 8B), sendo então mantida uma média de peso similar aos animais não infectados. Porém, os imunocomprometidos infectados com ZIKV BR apresentaram redução do peso em comparação aos animais não infectados após 14 dias de infecção (Figura 8C, 8D).

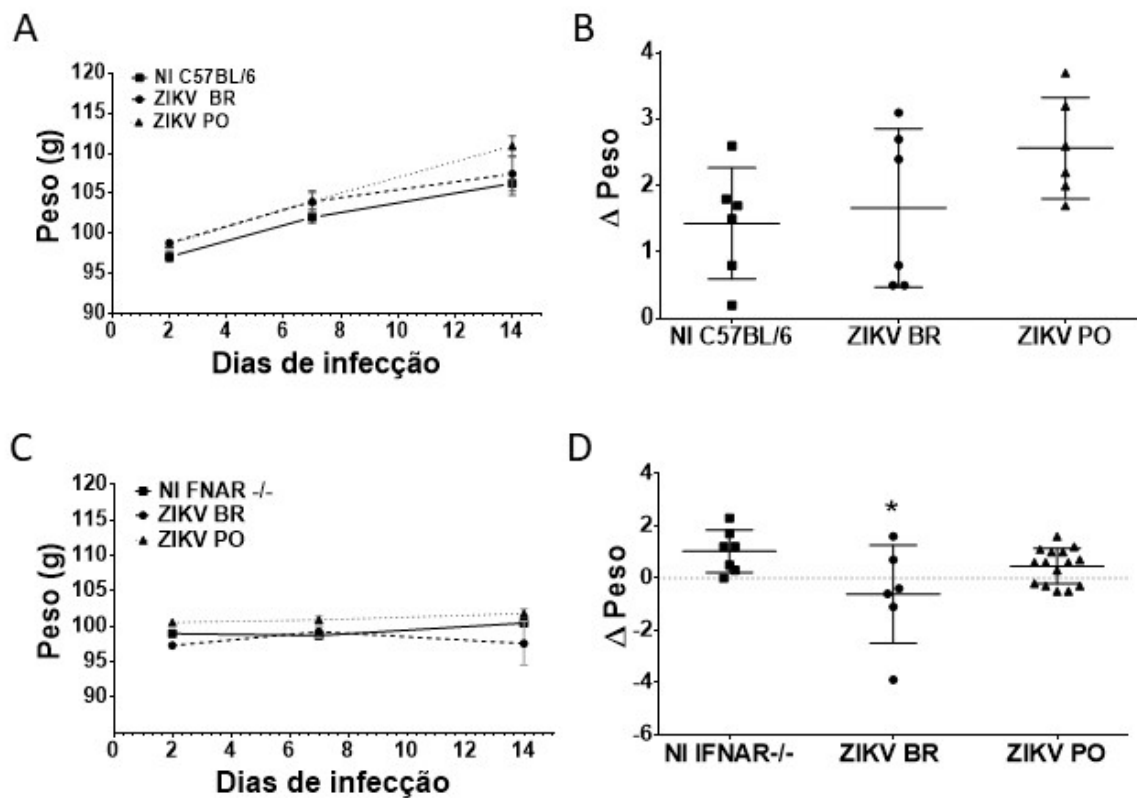


Figura 08. ZIK BR induziu perda geral de peso em animais imunocomprometidos quando comparados aos animais controle após 14 dias de infecção. Animais imunocomprometidos (IFNAR^{-/-}); representados nas figuras A e B; e imunocompetentes (C57BL/6); representados nas figuras C e D; foram infectados com o ZIKV BR e ZIK PO e durante os 14 dias de infecção foram pesados e avaliados a perda geral de peso. A e C mostram a progressão de ganho ou perda de peso no decorrer da infecção. B e C Mostram em média o ganho ou perda de peso dos animais, NI: Não infectado. (*) significa $p < 0.05$, pelo teste anova com múltiplas comparações. A linha no gráfico D representa o limite de perda e ganho de peso.

Procuramos então avaliar a cinética do crescimento viral nos diferentes modelos. Verificamos que apenas os animais imunocomprometidos apresentaram carga viral no plasma após 7 dias e 14 dias de infecção. Comprovamos ainda que os animais imunocompetentes têm a capacidade de responder e combater a infecção, sendo não detectado nenhum material genético viral no plasma desses animais após 14 dias de infecção. Porém verificamos material genético viral tanto de cepa ZIKV PO quanto da cepa ZIKV BR no plasma de animais imunocomprometidos após 14 dias de infecção. (Figura 9 A e B). Tendo em vista que o cérebro e o testículo são órgãos com privilégio imunológico e estão descritos como sendo alguns dos locais mais afetados pela infecção por ZIKV. Verificamos a carga viral desses órgãos nos diferentes modelos animais e identificamos que nos animais imunocomprometidos há carga viral tanto do isolado ZIKV BR, quanto o isolado ZIKV PO., diferentemente dos animais imunocompetentes que não foi detectada carga viral de ZIKV BR ou ZIKV PO no cérebro (Figura 9C). Além disso, fomos verificar a carga viral no testículo e identificamos que animais imunocomprometidos possuíam material genético da cepa ZIKV BR e ZIKV PO. Porém, um dado muito interessante mostrou que o isolado ZIKV BR conseguiu se estabelecer e permanecer nos testículos dos animais imunocompetentes enquanto que o isolado ZIKV PO foi apenas detectado no testículo de animais imunocomprometidos (Figura 9D).

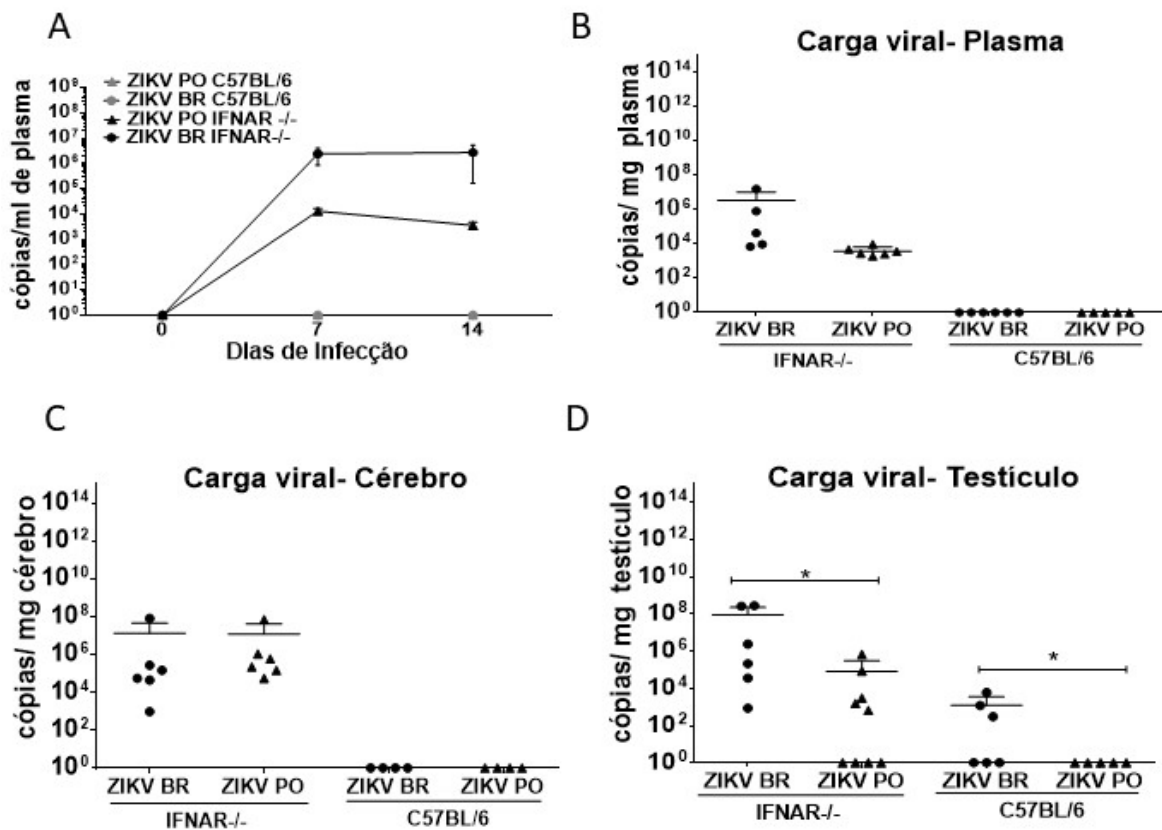


Figura 09. O isolado brasileiro ZIKV BR foi detectado em testículo de animais imunocompetentes e imunocomprometidos. Animais imunocomprometidos (IFNAR^{-/-}) e imunocompetentes (C57BL/6) foram infectados com ZIKV BR e o ZIKV PO e durante os 14 dias de infecção foi verificada a carga viral no plasma dos animais (A) além da comparação da carga viral no dia 14 pós infecção (B). Após 14 dias de infecção método de ddPCR avaliou a presença de carga viral no cérebro (C) e testículo dos animais (D). (*) significa p < 0.05, pelo teste Mann Whitney.

Como identificamos carga viral no testículo e não no cérebro de animais imunocompetentes infectados com a cepa ZIKV BR, decidimos avaliar se a infecção pelos dois isolados poderia alterar o peso e dimensões do testículo dos animais. Verificamos que nos animais imunocompetentes, que a infecção pelo ZIKV BR e não alterou as dimensões do testículo direito (Figura 10A e 10B) e também não houve alteração do peso testicular (Figura 10 C), entretanto, a infecção pela cepa ZIKV PO reduziu apenas a largura do testículo quando comparado ao não infectado (Figura 10 A, 10 B e 10 C). Quanto ao testículo esquerdo, observamos que a infecção pelas cepas ZIKV BR e ZIKV PO não promoveram nenhuma alteração nas dimensões e pesos testiculares após 14 dias de infecção (Figura 10 G,10 H e 10 I).

Quando avaliamos os animais imunocomprometidos, verificamos que o comprimento do testículo direito dos animais infectados pelo ZIKV BR apresentou uma redução significativa comparado ao testículo infectado pelo isolado ZIKV PO (Figura 10 D). Ademais, a largura do testículo direito dos animais imunocomprometidos infectados pelo isolado ZIKV BR apresentou uma redução em comparação aos animais infectados com o isolado ZIKV PO (Figura 10 E), porém não foram evidenciadas diferenças quando comparado o peso (Figura 10 F). O comprimento do testículo esquerdo dos animais infectados com ZIKV BR e ZIKV PO não apresentou alterações quando comparado ao comprimento do testículo dos animais não infectado (Figura 10 J). A largura do testículo esquerdo dos animais imunocomprometidos infectados com ZIKV BR foi reduzida comparada largura do testículo dos animais infectados com o isolado ZIKV PO (Figura 10 K). Contudo, quando comprado o peso dos testículos dos animais infectados e não infectados não houve diferença estatística (Figura 10 L).

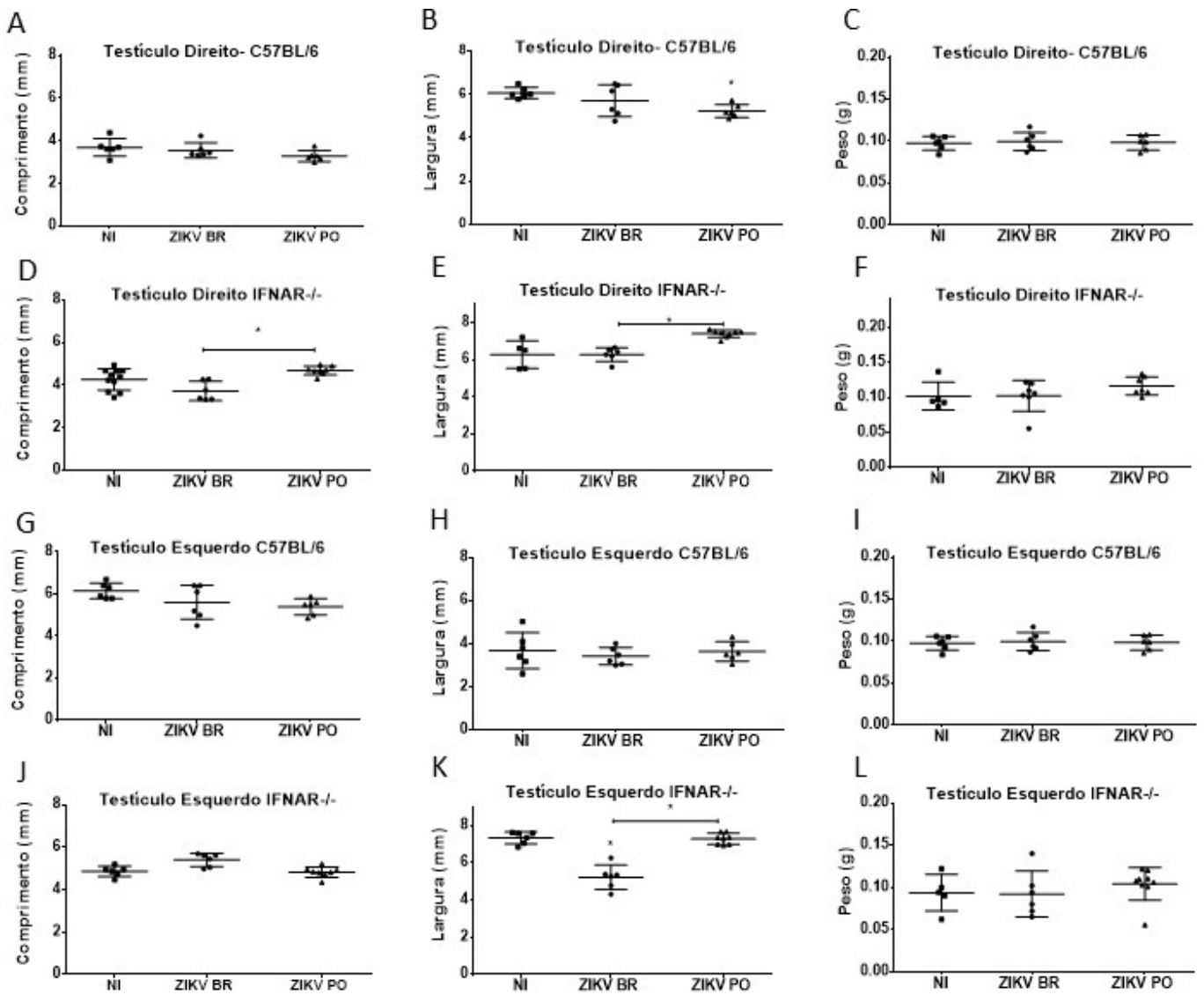


Figura 10. Peso do testículo dos animais não apresentou alteração entre os grupos, mesmo havendo algumas diferenças nas dimensões. Animais imunocompetentes (C57BL/6) foram infectados com ZIKV BR e ZIKV PO após 14 dias de infecção foi verificado o comprimento (A e G), largura (B e H) e peso (C e I) do testículo direito e esquerdo. Animais imunocomprometidos (IFNAR^{-/-}) também foram infectados com as duas cepas virais e após 14 dias foi verificado o comprimento (D e J), largura (E e K) e peso (F e L) do testículo direito e esquerdo. O peso do testículo esquerdo dos animais imunocompetentes (C57BL/6) (I) e imunocomprometidos (IFNAR^{-/-}) (J) foi verificado. NI: Não infectado. (*) significa $p < 0.05$, pelo teste Kruskal-Wallis com múltiplas comparações.

5.3 A infecção pelo ZIKV BR promove danos espermáticos aos animais infectados sem causar danos morfológicos evidentes e não altera o perfil inflamatório testicular.

Avaliamos alguns efeitos da infecção pela cepa ZIKV BR em testículo de animais imunocompetentes. Verificamos inicialmente que não há diferença de peso do testículo e dimensões do testiculares de animais infectados com a cepa ZIKV BR e não infectados (Figura 11A e Figura 10 A, B, C, G, H e I).

Verificamos ainda que a infecção pelo ZIKV BR não alterou a concentração espermática no epidídimo direito e no epidídimo esquerdo (Figura 11B). Porém as Análises de mobilidade progressiva mostraram que tanto os espermatozoides do epidídimo direito e do epidídimo esquerdo dos animais que foram infectados pelo ZIKV BR apresentaram uma redução significativa quando comparados aos animais não infectados (Figura 11C). Além disso, os espermatozoides do epidídimo direito e esquerdo infectados com ZIKV apresentaram uma redução na porcentagem de espermatozoides móveis (Figura 11D). Por fim, verificamos que a infecção pelo ZIKV BR promoveu uma redução significativa na morfologia normal dos espermatozoides do epidídimo direito e esquerdo quando comparados aos animais não infectados (Figura 11E)

Tomados em conjuntos os dados citados anteriormente indicam que a infecção pela cepa ZIKV BR em 14 dias de infecção não apresenta danos morfológicos evidentes ao testículo de animais imunocompetentes, porém pode-se notar os efeitos na morfologia normal do espermatozoide e motilidade dos espermatozoides, sendo um indicativo de comprometimento da fertilidade nesses animais.

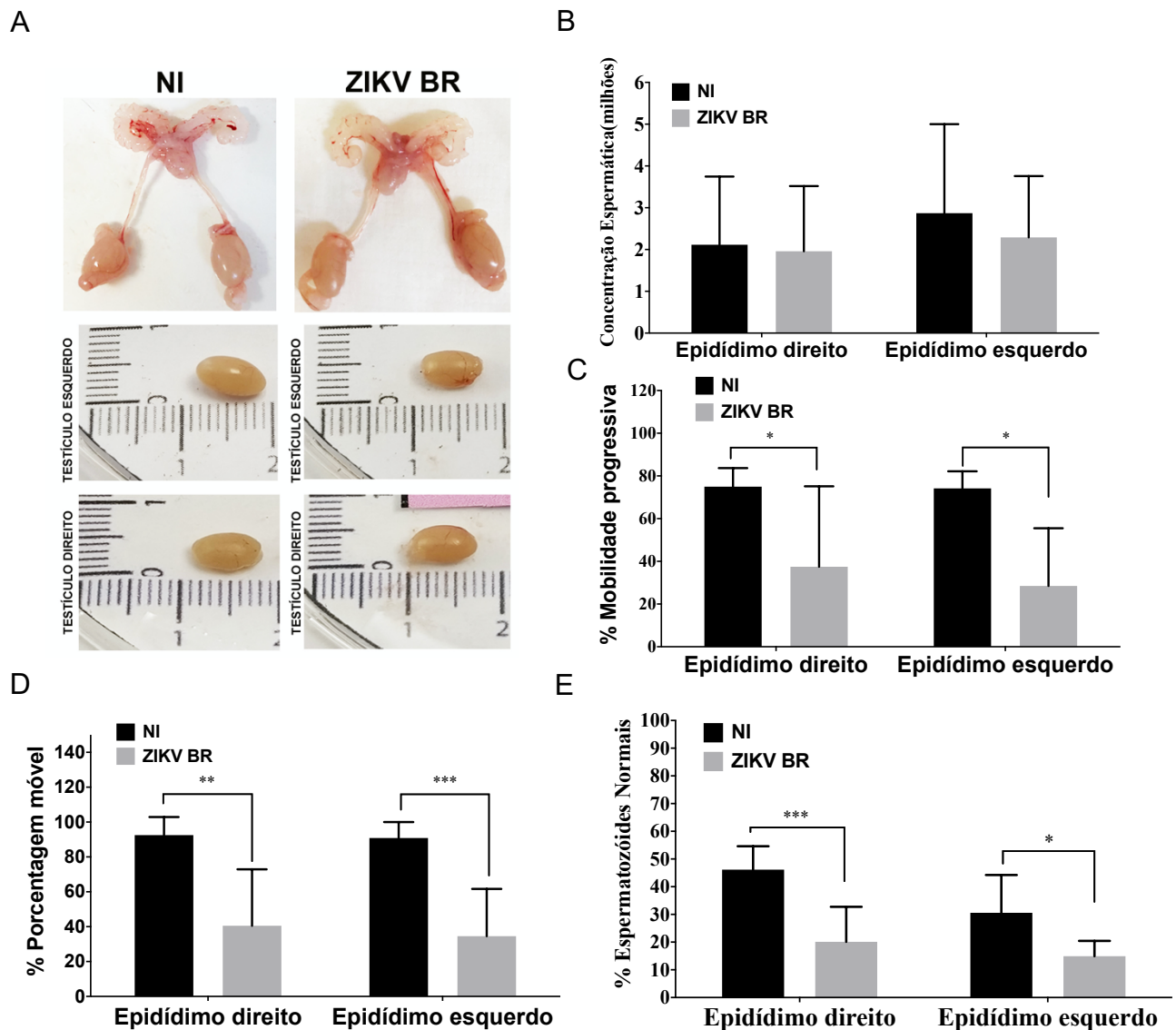


Figura 11. Alterações morfológicas e em parâmetros espermáticos provocados pela infecção com ZIKV BR em animais imunocompetentes. Animais imunocompetentes (C57BL/6) foram infectados com o ZIKV BR após os 14 dias de infecção foi verificada a morfologia do trato reprodutor masculino (A) demonstrado em imagens representativas de um n com 6 animais. Além disso após a realização do flush epididimal foi analisada a concentração espermática (B), mobilidade progressiva (C), porcentagem de espermatozoides móveis (D) e normalidade espermática dos espermatozoides isolados (E). NI: Não infectado. (*) significa $p < 0.05$, pelo teste Mann-Whitney.

Alguns estudos demonstraram que a infecção por ZIKV é capaz de provocar inflamação testicular, denominada orquite (CLANCY et al., 2019). Esse processo inflamatório exige cuidados pois pode desencadear sérios problemas para a fertilidade masculina. Com isso, decidimos avaliar algumas citocinas para uma caracterização do perfil inflamatório testicular. Fomos averiguar se os níveis de citocinas IL-1 β , IL-10, IL-6, TGF- β e TNF- α poderiam estar alterados pela infecção do ZIKV BR no testículo e soro de animais imunocompetentes. Verificamos que os níveis de citocina IL-1 β (Figura 12 A), IL-10 (Figura 12 B), IL-6 (Figura 12 C), TGF- β (Figura 12 D) e TNF- α (Figura 12 E), não foram alterados pela infecção tanto no soro quanto no testículo desses animais.

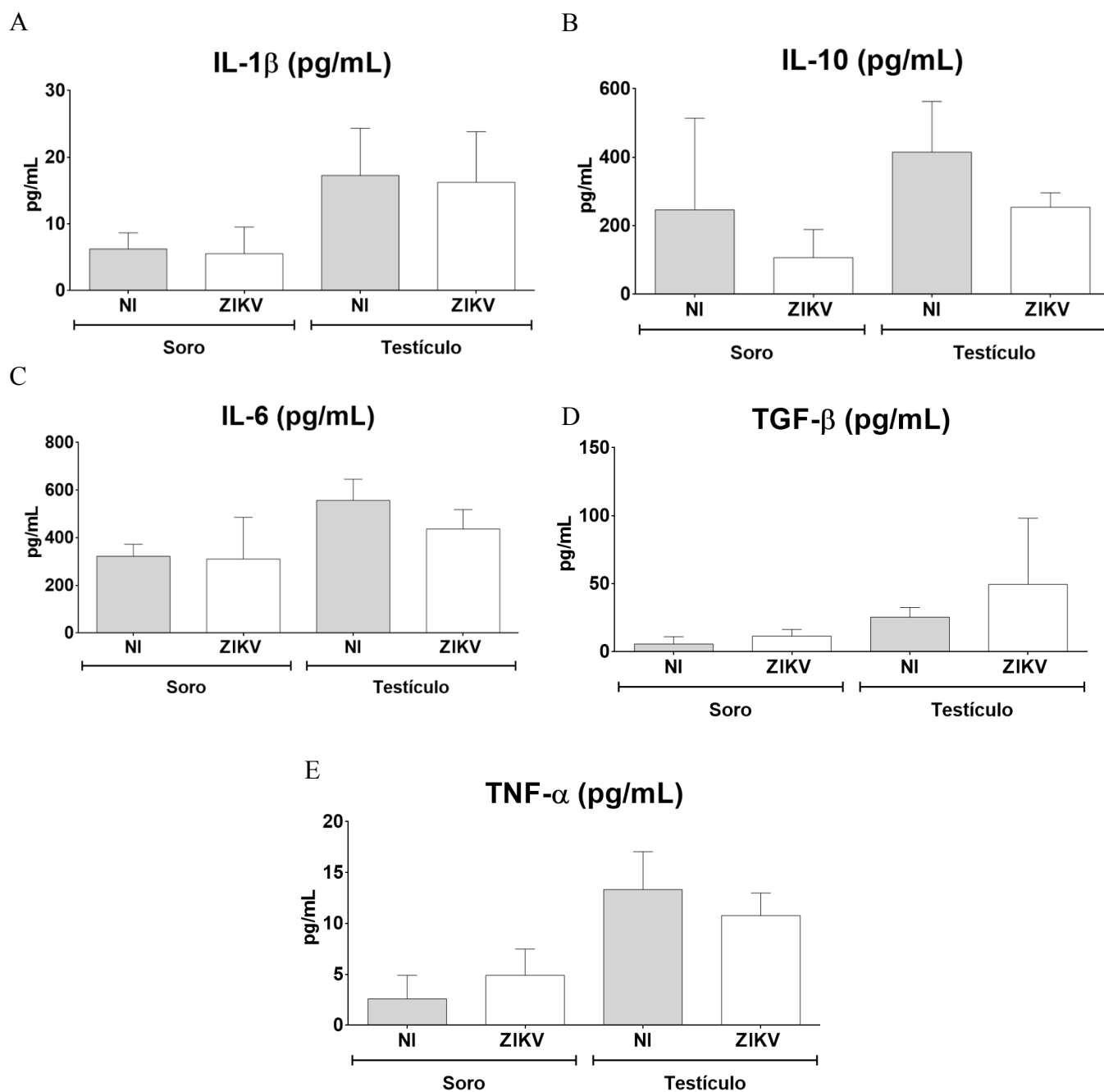


Figura 12. Análise do perfil inflamatório do testículo dos animais imunocompetentes infectados por ZIKV BR. Animais imunocompetentes (C57BL/6) foram infectados com ZIKV BR e após os 14 dias de infecção foi verificado o perfil inflamatório do macerado do testículo e do soro desses animais, sendo então analisado as citocinas IL-1 β (A), IL-10 (B), IL-6 (C), TGF- β (D) e TNF- α (E). NI: Não infectado. Teste estatístico realizado: teste Mann-Whitney

5.4 A infecção pelo ZIKV altera o perfil metabólico do testículo dos animais imunocompetentes

Nossos dados de PCR em tempo real sugerem que os testículos de animais imunocompetentes suportam a replicação viral de ZIKV BR mesmo após a infecção viral no sangue ter sido resolvida (Figura 9 D). Além disso, verificamos que os parâmetros de análise de fertilidade foram modulados pela infecção de ZIKV BR e não houve alterações do perfil inflamatório testicular (Figura 11 e Figura 12). Somando-se esses dados, decidimos investigar melhor as consequências da infecção no testículo, avaliando o perfil metabólico do testículo, após a infecção por ZIKV BR em animais imunocompetentes. No estudo foi utilizada a técnica de cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC-MS) para determinar o metaboloma do testículo de cinco animais não infectados e cinco animais infectados.

Após a identificação dos metabólitos, os dados foram submetidos a análise estatística multivariada e dos principais componentes (PCA) com o intuito de correlacionar os principais metabólitos. Análises de bioinformática também foram realizadas a fim de identificar as vias metabólicas associadas com a patogênese. Em modo positivo foi identificado o total de 16.452 picos que foram encontrados e 25 picos foram identificados com significância estatística. Porém no modo negativo foi identificado o total de 9358 picos desses encontrados 154 picos foram identificados com significância estatística (Figura 13 A e B). A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) revelou uma separação distinta entre o testículo infectado pelo ZIKV BR e o não infectado (Figura 13 C e D).

\

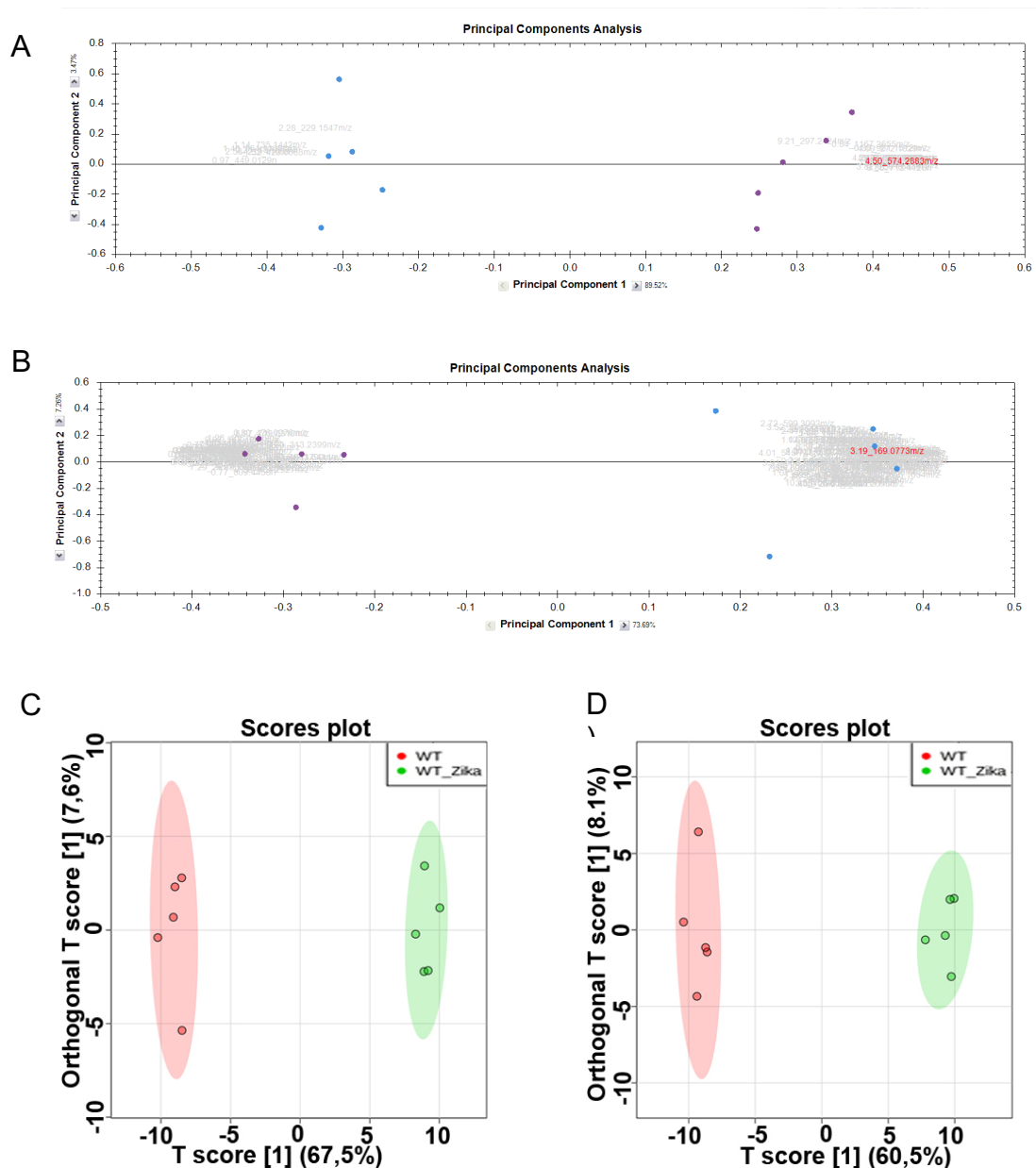


Figura 13. Perfil metabólico do testículo de animais imunocompetentes infectados com o isolado ZIKV BR. Gráficos de pontuação de metabólitos testículos de camundongos C57BL/6 com modelo PCA sob modo de íons positivo (A) e negativo (B), sendo azul amostras provindas de animais não infectados e roxo amostras provindas de animais infectados com ZIKV BR (A e B). PCA modo positivo mostrou o total de 16.452 picos foram encontrados e 25 picos foram identificados com Anova p-valor $\leq 0,05$; (B) O modo PCA negativo mostrou que o total de 9358 picos foram encontrados e 154 picos foram identificados com o valor p de Anova $\leq 0,05$; Plotagem dos escores PLS-DA no testículo infectado e não infectado pelo ZIKV BR nos modos (C) positivo e (D) negativo. Pontuação VIP $\geq 1,5$. WT: Não Infectado, WT ZIKA: Animal infectado com ZIKV BR.

Foram identificados um total de 16.452 picos (íons únicos) em ionização positiva (Figura 14 A) e 9.358 picos (íons únicos) em ionização negativa (Figura 14B). Usando qualidade e dados estatísticos de filtragem, 154 e 25 desses picos foram considerados estatisticamente diferentes (p -valor $\leq 0,05$), respectivamente, entre as amostras infectadas e não infectadas. Após a identificação dos íons das Análises em modo negativo, verificamos que houve a modulação de alguns metabólitos relacionados ao metabolismo energético. Verificamos que o testículo de animais infectados com ZIKV BR apresenta a modulação na abundância de alguns metabólitos como:

Modulação da abundância	Metabólitos	Função	p valor
Aumento	*(2E)-4-Hydroperoxy-2-nonenal	Metabólito produzido a partir do metabolismo de ácido graxo (Peroxidação fosfolipídica). Também usado como marcador de estresse oxidativo	0,017
Aumento	*L-Threoneopterin	Produto catabólico do GTP. Sintetizado por macrófagos após a estimulação com Interferon-gama. Também usado como ,marcador de infecção viral, principalmente para HIV).	0,05
Aumento	*9-Oxononanoic acid	É classificado como membro dos ácidos graxos de cadeia média. Esse ácido induz a atividade de fosfolipase A2 e a produção de Tromboxano A2 no sangue.	0,008
Aumento	*Ácido Inosínico	Primeiro Nucleotídeo formado durante a síntese de purina	0,05
Redução	*Coenzima A	Papel na síntese e oxidação dos ácidos graxos. Além de desempenhar função na oxidação do piruvato no ciclo do ácido cítrico.	0,03
Redução	*Adenosine diphosphate	Produzido quando há alguma descarboxilação em alguns compostos da glicólise no ciclo de Krebs.	0,04

Tabela 03. Modulação na abundância relativa de alguns metabólitos identificados no testículo de animais infectados com ZIKV BR.

A análise do mapa de calor (heat map), com base na pontuação de VIP, e as análises univariadas indicaram que glicose (D-Glucose) foi significativamente maior no testículo de animais infectados com ZIKV BR quando comparados aos não infectados (Figura 15 A). Análise adicional de cada um destes picos significativos putativamente identificados, em modo positivo Glicose ($mz = 163,0607$, M + H) e em modo negativo de D-glicose ($mz = 179,0551$, MH), apresentaram aumento significativo na abundância relativa entre os tipos de amostra. Além disso, o perfil de abundância relativa de glicose, foi maior em amostras de testículos infectados quando comparado com amostras não infectadas (Figura 15 D e E). Para confirmar, os dados de glicose nós utilizamos uma análise de LC-MS comparando um standard D-glicose e a amostra WT ZIKV usando os mesmos métodos de metabolômica (Standard D-Glucose 100ng/mL in 95:5 (PMA: PMB) com espectro de referência Synapt G2-si). Obtivemos o mesmo padrão de fragmentação, validando o achado de que realmente a abundância relativa de glicose está sendo aumentada pela infecção de ZIKV BR no testículo dos animais imunocompetentes (Figura 15 B).

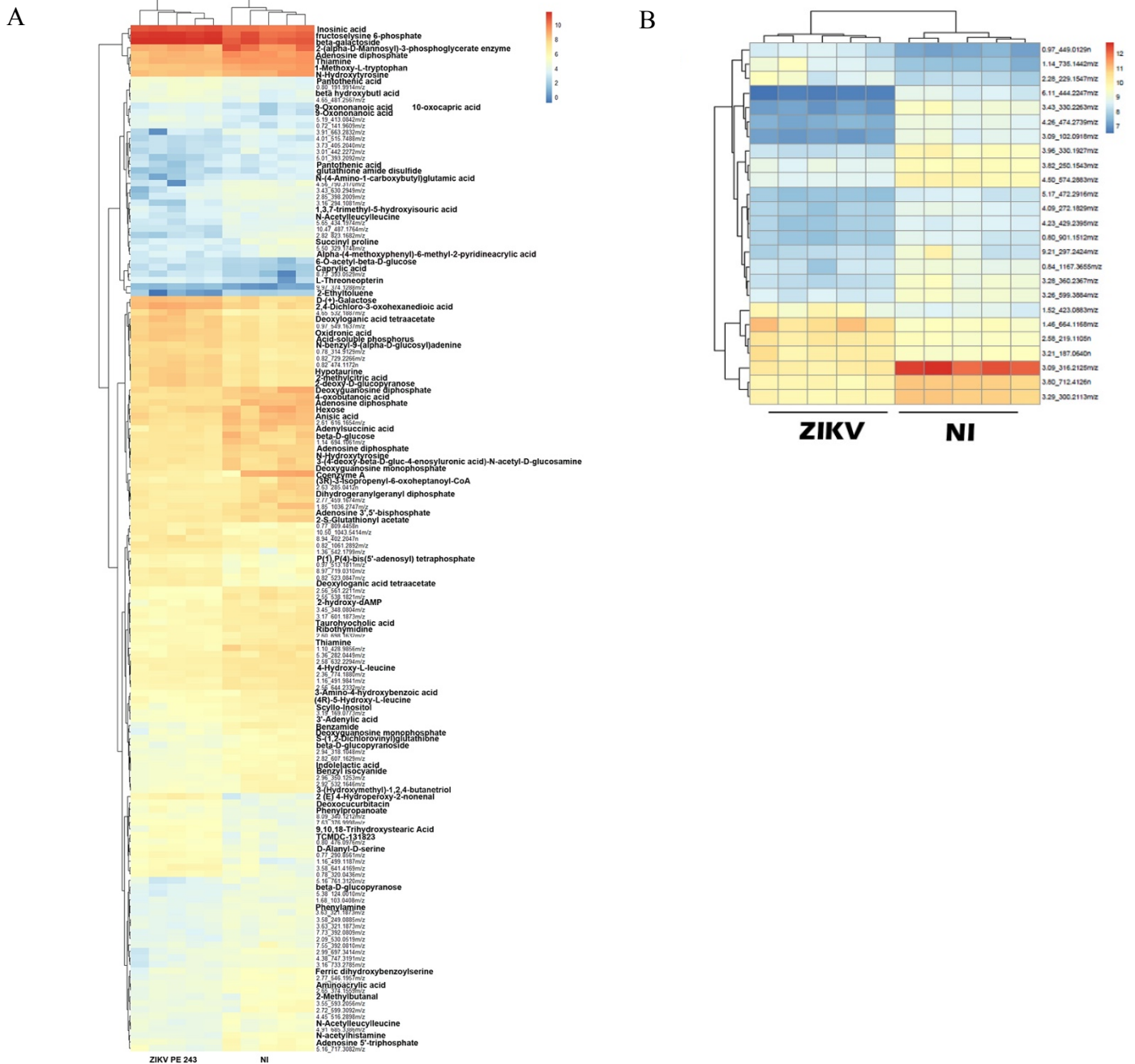
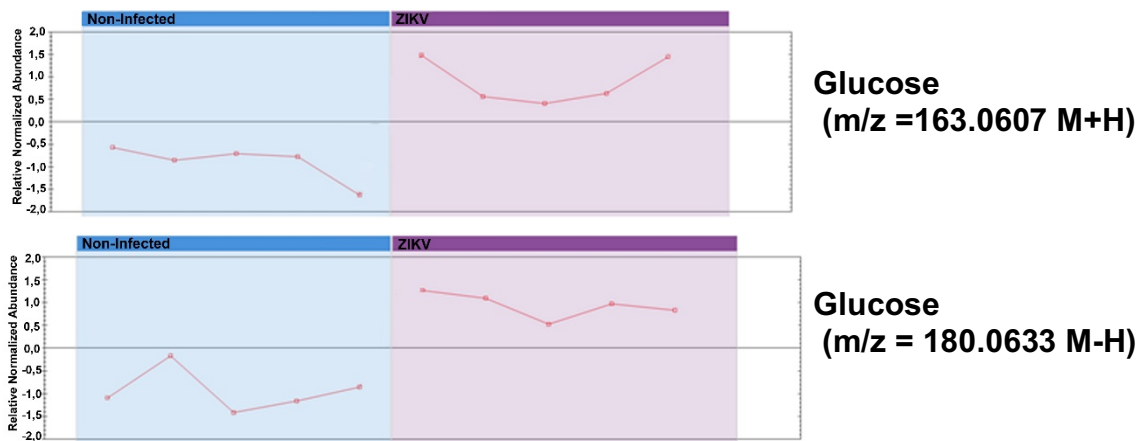


Figura 14. Mapa de calor do perfil metabólico do testículo de animais imunocompetentes infectados com o isolado ZIKV BR. A partir dos gráficos de pontuação de metabólitos testículos de camundongos C57BL/6 com modelo PCA foi gerado o mapa de calor com a identificação dos íons em modo negativo (A) e em modo positivo (B). Foram encontrados e 25 picos foram identificados com anova p-valor $\leq 0,05$ no modo positivo e foram encontrados 9358 picos com o valor p de anova $\leq 0,05$ no modo negativo. A análise estatística foi realizada utilizando o software Progenesis QI e a identificação do pico foi feita usando os bancos de dados KEGG e BioCyc.

A



B

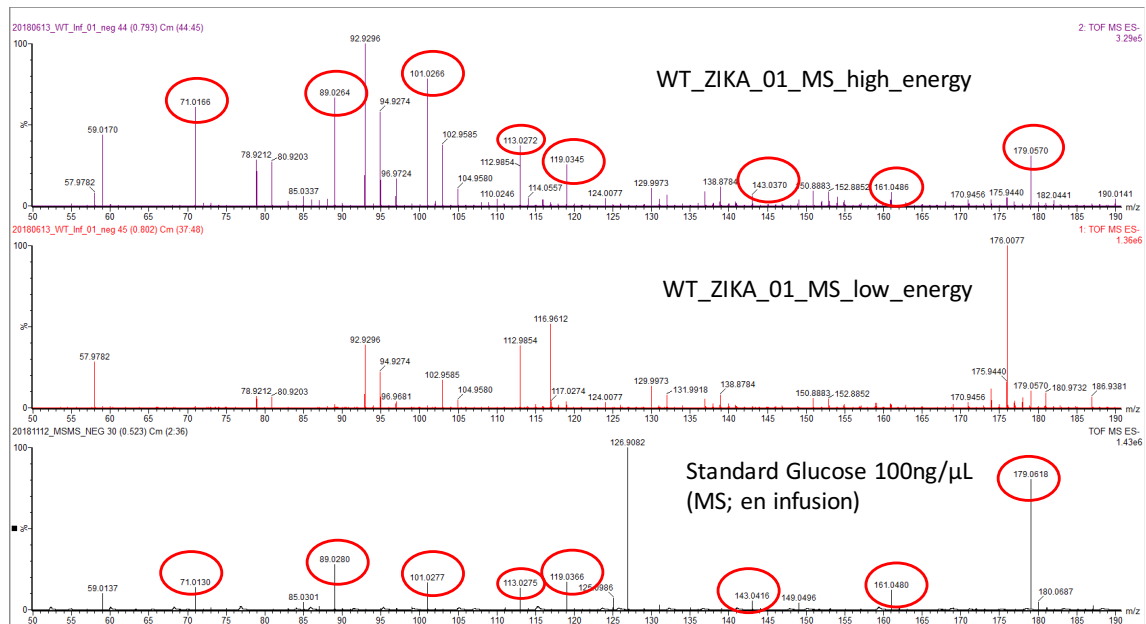


Figura 15. Testículo de animais infectados com ZIKV BR apresentam uma maior abundância relativa de Glicose. Abundância relativa de glicose foi gerada utilizando o software Progenesis QI. Foi então avaliada a abundância relativa em modo positivo (primeiro gráfico) e em modo negativo (segundo gráfico) (A). Foi comparado por LC-MS no modo negativo uma o padrão de fragmentação das amostras de ZIKV BR com uma glicose padrão (B).

Devido a alteração da abundância de glicose no testículo, decidimos avaliar a glicemia dos animais. Verificamos a glicose no sangue dos animais não infectados e infectados com a cepa ZIKV BR e verificamos que a glicemia não é alterada, sendo que a abundância de glicose ocorrendo apenas no testículo dos animais infectados com a cepa ZIKV BR e não de forma sistêmica (Figura 16).

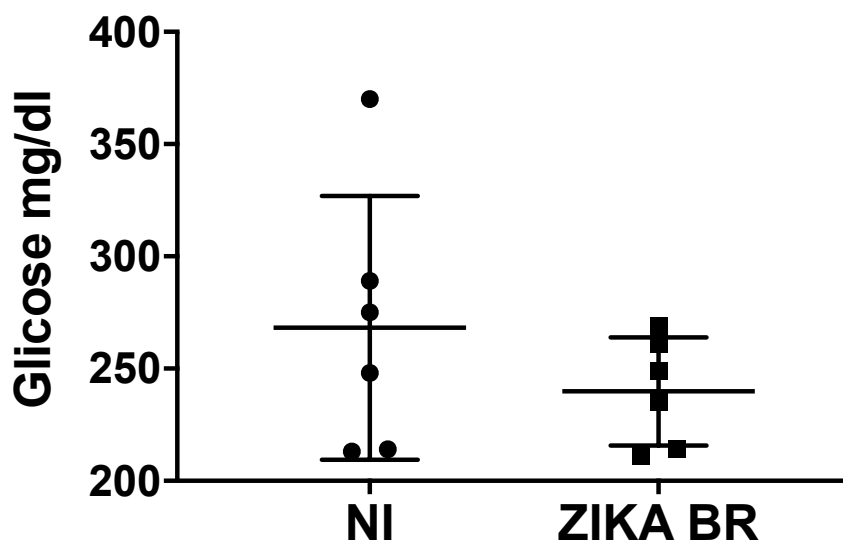


Figura 16. O nível glicêmico não foi alterado pela infecção da cepa ZIKV BR em animais imunocompetentes. O nível glicêmico dos animais foi após 8 horas de jejum, no décimo quarto dia da infecção. A leitura foi realizada por um glicosímetro. Teste estatístico realizado: teste Mann-Whitney.

Verificamos nos dados apresentados anteriormente que o testículo de animais infectados por ZIKV BR apresenta variação na abundância de alguns metabólitos quando comparados ao não infectado. Devido ao aumento da abundância de glicose no testículo, decidimos verificar se a concentração de ATP poderia ter alguma alteração em testículo de animais imunocompetentes infectados por ZIKV BR. Por ensaio de bioluminescência verificamos que a concentração de ATP no testículo destes animais infectados ou não com a cepa ZIKV BR não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 17).

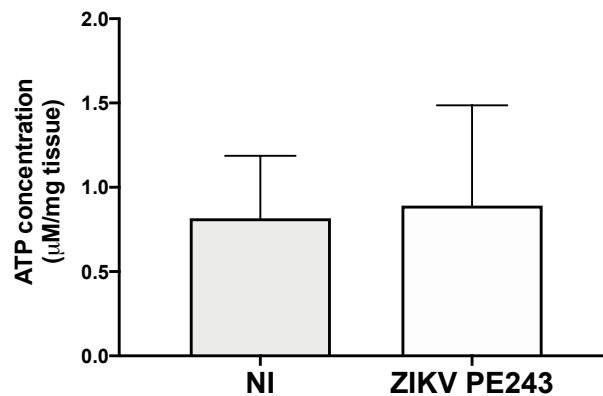


Figura 17. Quantificação da concentração de ATP em testículo de animais imunocompetentes infectados por ZIKV BR. Animais imunocompetentes (C57BL/6) foram infectados com ZIKV BR após os 14 dias de infecção foi verificado no macerado do testículo a total concentração de ATP. Sendo o método de extração utilizado foi por Phenol-TE que está descrito por Chida e colaboradores (CHIDA et al., 2012). Teste estatístico realizado: teste Mann-Whitney.

5.5 Efeito da infecção de ZIKV BR no testículo de camundongos imunocompetentes e sua modulação na via glicolítica

Previamente demonstramos que a infecção por ZIKV BR modula alguns metabólitos e em especial a glicose. A fim de investigar se, hipoteticamente, as expressões dos genes da via glicolítica poderiam estar respondendo ou sendo modulados pela infecção do ZIKV BR, avaliamos por qRT-PCR a expressão dos genes: Enolase, PGK1, PGK2, HPRT e Hexoquinase 1 (Tabela 03). Foi observado que não houve diferença de níveis medianos de expressão gênica, em nível transcricional entre os grupos não infectados e infectados por ZIKV BR para nenhum gene citado acima (Figura 18).

Gene	Primers	Produto	Referência
PGK1	5'- GCT CAC TTC CTT TCT CAG GCA G- 3' 5'-TAG TGG CTG AGA TGT GGC ACA G-3'	166bp	(MORI et al., 1986; SINGER- SAM et al., 1990)
PGK2	5'-ATT GTC ATA ATG TAC TTG CTT CC-3' 5'-GTT TCC TCC CTA GGA AGG ACT GG-3'	255bp	(BOER et al., 1987)
Hipoxantina Fosforribosiltransferase (HPRT)	5'- CGA GGA GTC CTG TTG ATG TTG C -3'' 5'- CTG GCC TAT AGG CTC ATA GTG C-3'	172bp	(MELRON, 1987)
Enolase 4	5'- ATG GGA GAT GAA GAC GGC GG-3' 5-GCA GGC TGG AGG TAG AGG GT-5'	146bp	(NAKAMURA et al., 2013; NM_178689.4, [s.d.])
Hexoquinase I	5'-TGC CAT GCG GCT CTC TGA TG-3' 5'- CTT GAC GGA GGC CGT TGG GTT-3'	106bp	(MORI et al., 2005; NAKAMURA et al., 2008)
β -actina	5'-TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA-3' 5'- GGG GTG TTG AAG GTC TCA AAA-3'	165bp	(NM_007393.3, [s.d.])

Tabela 04. Primers usados para a análise de RT-qPCR.

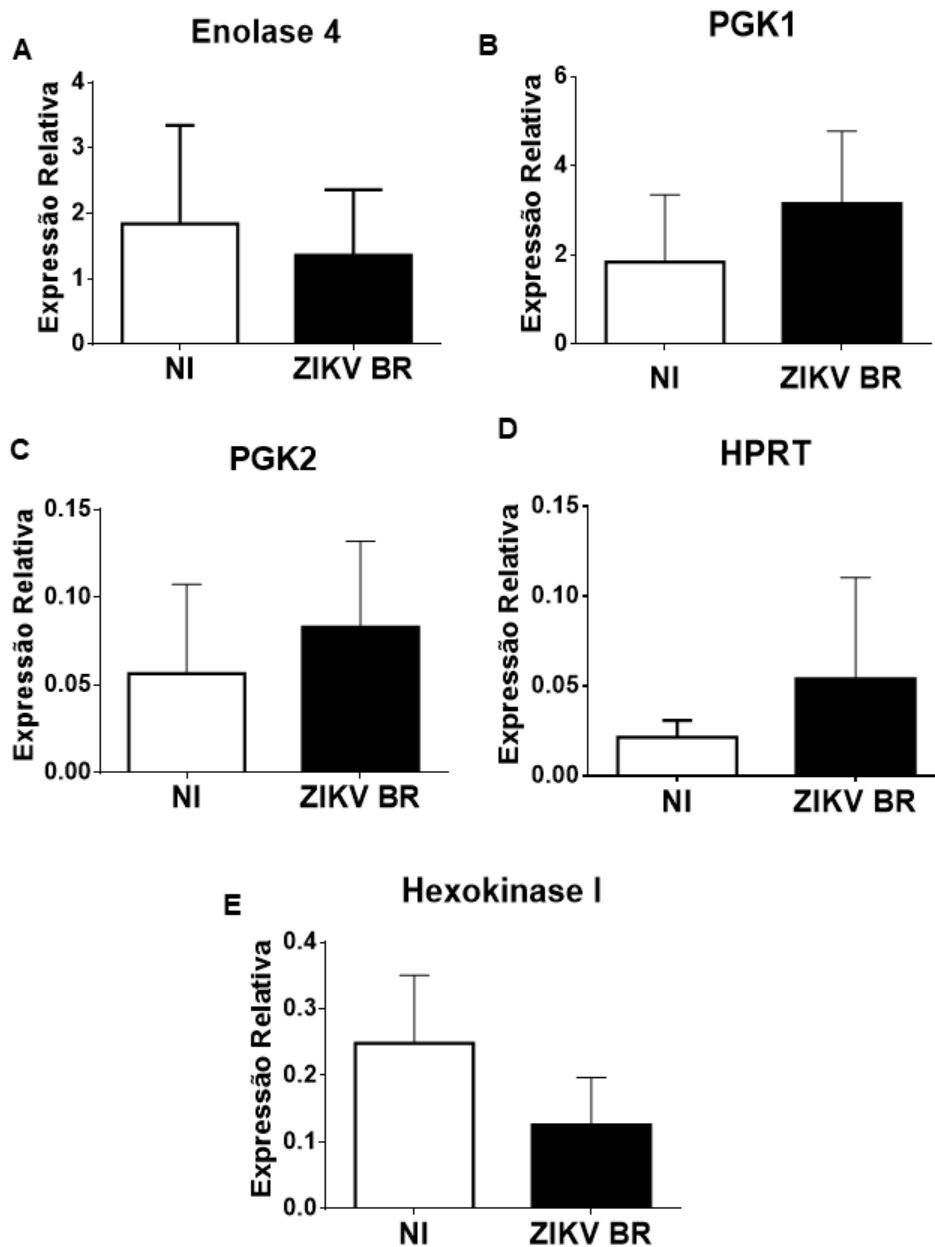


Figura 18. Modulação da expressão de genes relacionados à via glicolítica pela infecção por ZIKV BR no testículo de camundongos imunocompetentes. RNA de testículos de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV BR foram extraídos, processados e realizada a análise da expressão gênica por RT-qPCR de Enolase 4 (A), PGK1 (B), PGK2 (C), HPRT (D) e Hexoquinase. Teste estatístico realizado: teste Mann-Whitney

Decidimos avaliar se as proteínas poderiam estar sendo moduladas pela infecção. Para isso utilizamos proteínas extraídas de testículos de animais imunocompetentes e imunocomprometidos infectados com os isolados virais ZIKV BR e ZIKV PO.

Verificamos que o testículo dos animais imunocompetentes infectados com a cepa ZIKV BR apresentaram uma redução na abundância da proteína PGK2 (Figura 19 A e C), e Hexoquinase (Figura 19 A e F), quando comparados ao homogeneizado do testículo de animais não infectados. Entretanto a infecção pelo ZIKV BR não apresentou nenhuma alteração estatística na expressão de PGK1 (Figura 19 A e B), GLUT2 (Figura 19 A e D) e GLUT3 (Figura 19 A e E) quando comparado ao homogeneizado do testículo de animais não infectados. É interessante notar que diferentemente do que acontece com a expressão gênica, a abundância das proteínas supracitadas está sendo modulada indicando que a infecção por ZIKV BR está alterando o metabolismo da glicose á nível proteico.

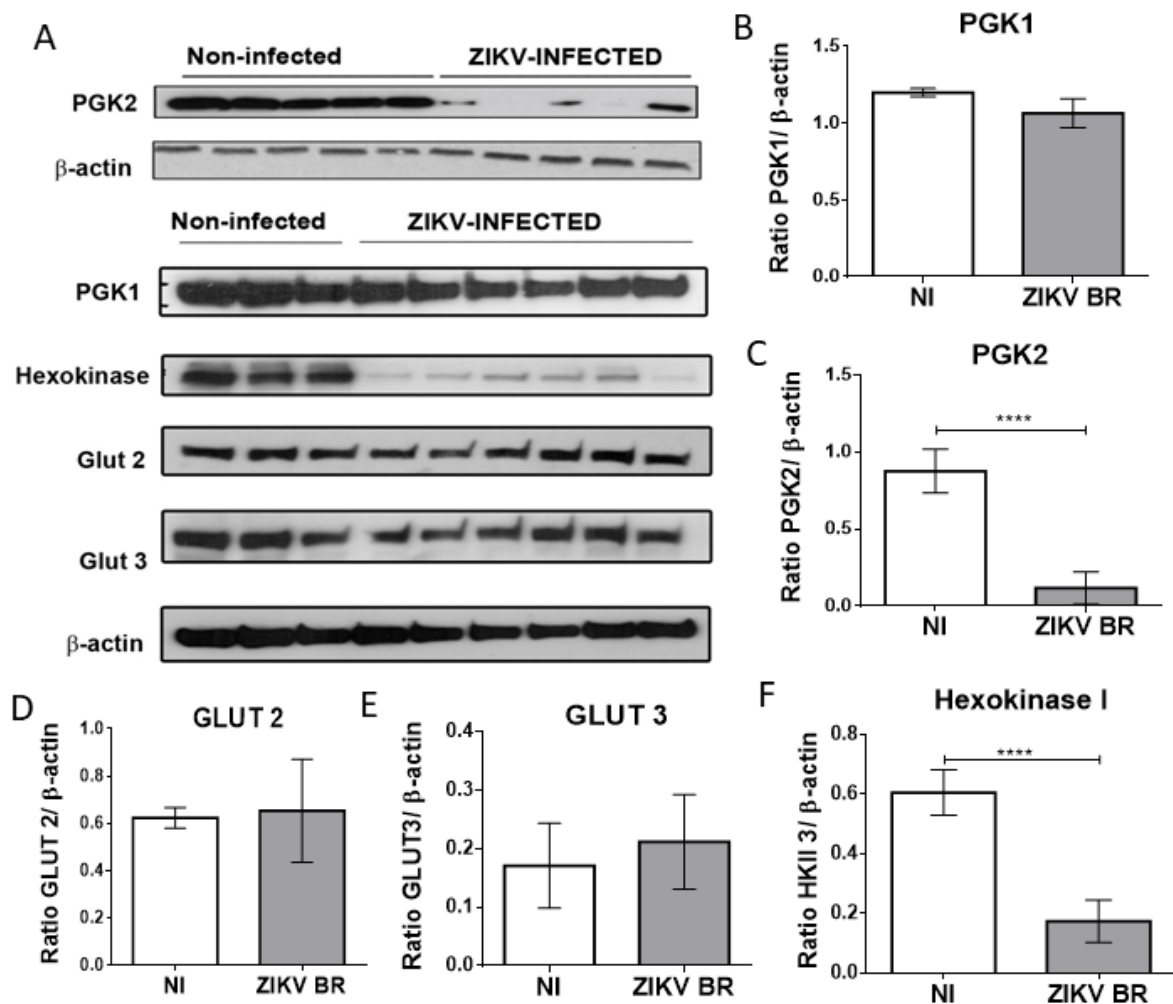


Figura 19. Modulação da expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica pela infecção por ZIKV BR no testículo de camundongos imunocompetentes. Camundongos C57BL/6 foram infectados com ZIKV BR e tiveram o testículo coletado e homogeneizado e consequentemente as proteínas foram extraídas. Foram analisadas por Western Blot as proteínas: PGK2, PGK1, Hexoquinase I, Glut 2, Glut 3 e β -actina (A). Foi verificada a razão entre as proteínas de interesse e a β -actina por densitometria utilizando o software ImageJ. (*) significa $p < 0.05$, pelo teste Mann-Whitney.

Verificamos ainda se o mesmo evento que encontramos nos animais imunocompetentes poderia estar se repetindo nos animais imunocomprometidos. Com isso, proteínas de homogeneizado de testículos de animais IFNAR^{-/-} infectados com a cepa ZIKV BR foram avaliadas por Western Blot (PGK2, PGK1, GLUT2, GLUT3, Hexoquinase I e β -actina). Observamos que o testículo dos animais IFNAR^{-/-} infectados com a cepa ZIKV BR apresentaram uma redução na expressão da proteína PGK2 (Figura 20 A e C), PGK1 (Figura 20 A e B) e GLUT3 (Figura 20 A e D), quando comparados ao homogeneizado do testículo de animais não infectados. Entretanto a infecção pelo ZIKV BR não apresentou nenhuma alteração estatística na expressão de Hexoquinase I (Figura 20 A e F), como vimos nos animais imunocompetentes. Além disso, a expressão de GLUT2 (Figura 20 A e E), apresentou-se aumentada no testículo de animais infectados com ZIKV BR quando comparados aos animais não infectados.

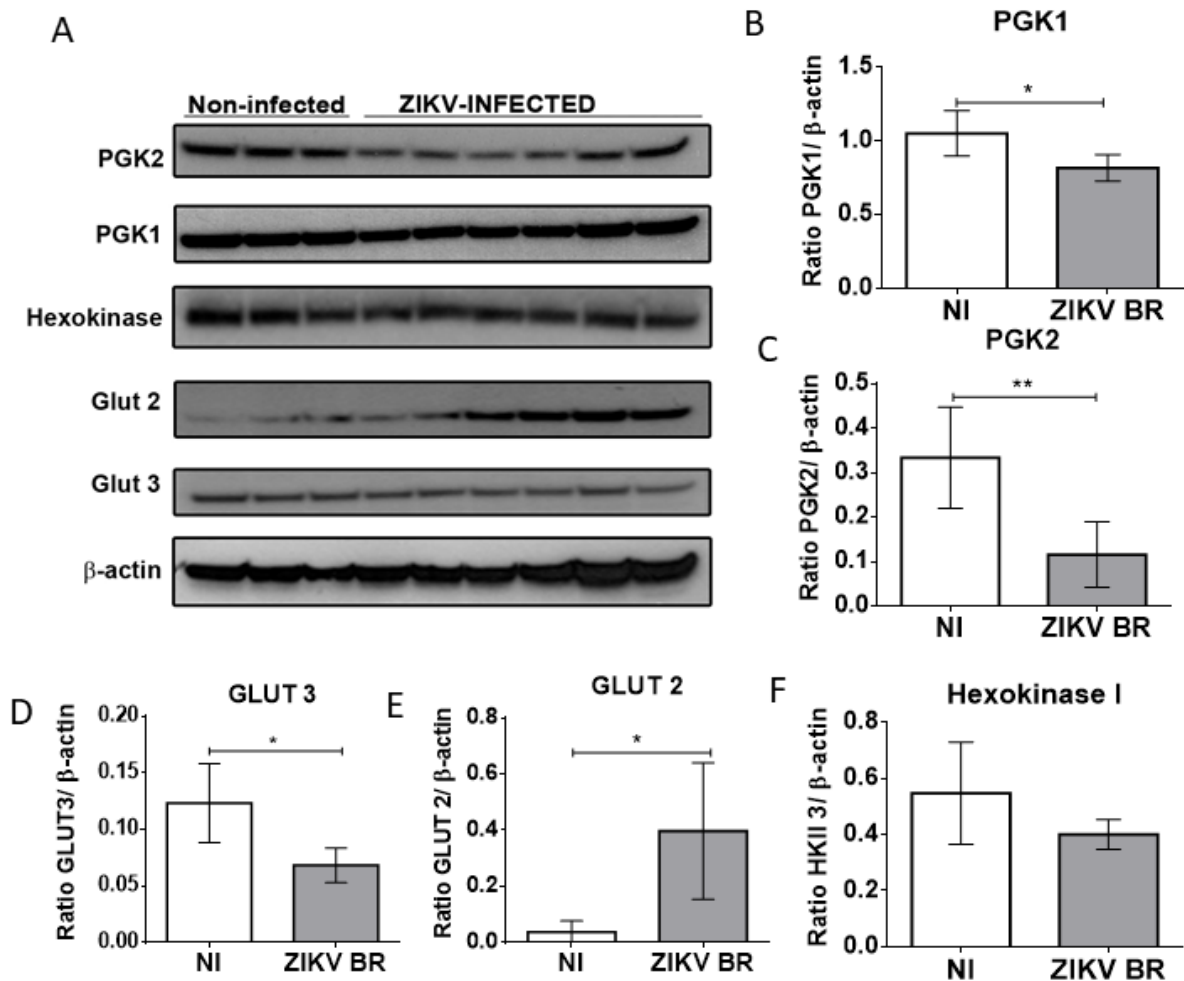


Figura 20. Modulação da expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica pela infecção por ZIKV BR no testículo de camundongos imunocomprometidos. Camundongos *IFNAR^{-/-}* foram infectados com ZIKV BR e tiveram o testículo coletado e homogeneizado e consequentemente as proteínas foram extraídas. Foram analisadas por Western Blot as proteínas: PGK2, PGK1, Hexoquinase I, Glut 2, Glut 3 e β-actina (A). Foi verificada a razão entre as proteínas de interesse e a β-actina por densitometria utilizando o software ImageJ. (*) significa $p < 0.05$, pelo teste Mann-Whitney.

Devido à modulação diferencial na abundância das proteínas PGK2, PGK1, Hexoquinase 1, GLUT 2 e GLUT3, decidimos verificar se o mesmo fenômeno poderia estar ocorrendo nos dois modelos animais, porém utilizando a cepa viral ZIKV PO. Para os animais imunocompetentes, verificamos que o testículo dos animais infectados com ZIKV PO apresentaram uma redução na expressão da proteína PGK1 (Figura 21 A e B), quando comparados ao homogeneizado do testículo de animais não infectados. Entretanto a infecção pelo ZIKV PO não apresentou nenhuma alteração significativa na expressão de PGK2 (Figura 21 A e C), GLUT2 (Figura 21 A e D), GLUT3 (Figura 21 A e E) e Hexoquinase (Figura 21 A e F), quando comparado ao homogeneizado do testículo de animais não infectados.

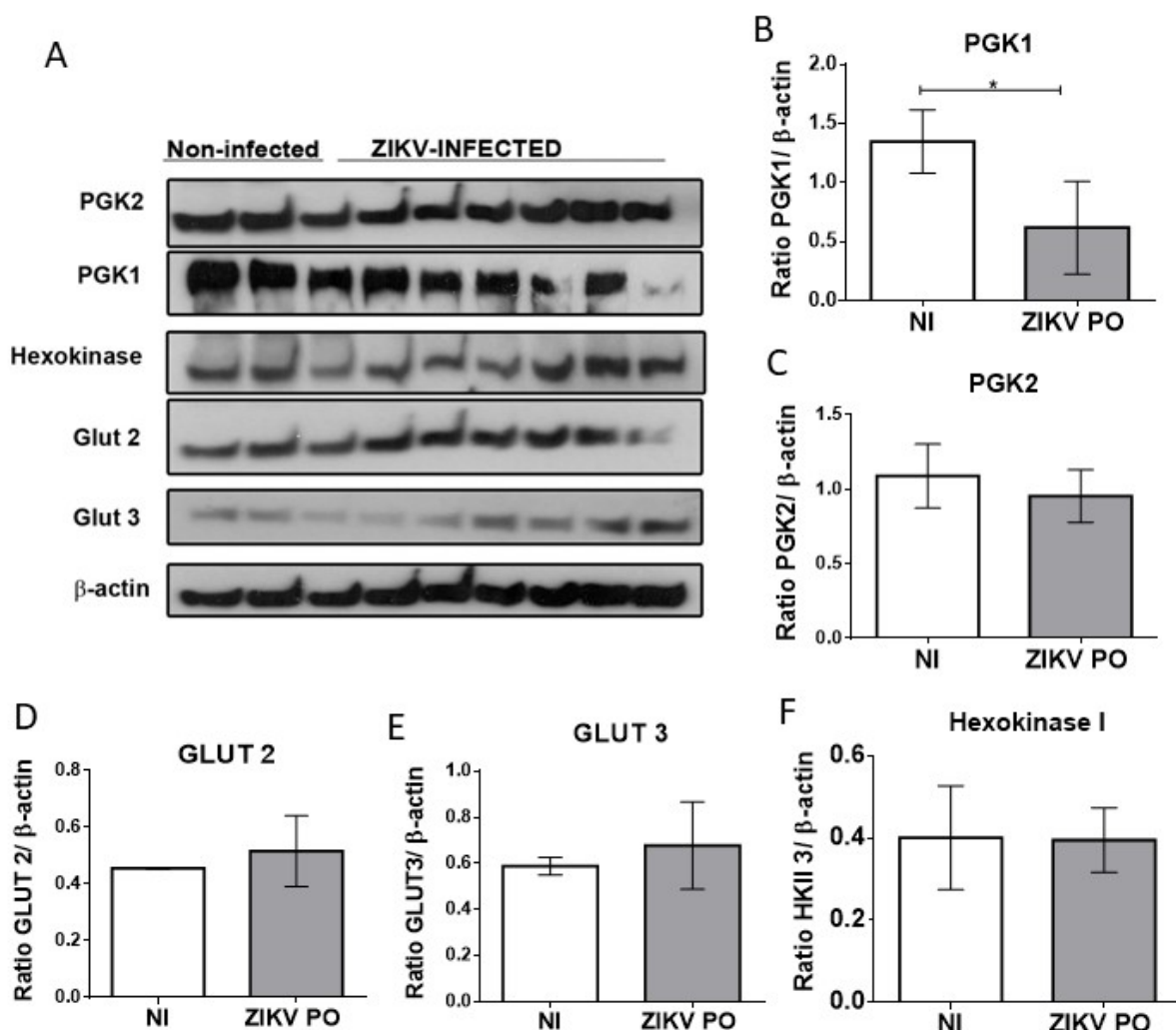


Figura 21. Modulação da expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica pela infecção por ZIKV PO no testículo de camundongos imunocompetentes. Camundongos C57BL/6 foram infectados com ZIKV PO e tiveram o testículo coletado e homogeneizado e consequentemente as proteínas foram extraídas. Foram analisadas por Western Blot as proteínas: PGK2, PGK1, Hexoquinase I, Glut 2, Glut 3 e β-actina (A). Foi verificada a razão entre as proteínas de interesse e a β-actina por densitometria utilizando o software ImageJ. (*) significa $p < 0.05$, pelo teste Mann-Whitney.

De forma bem interessante, observamos ainda algo similar ao obtido a partir do homogeneizado de testículo de animais imunocomprometidos infectados com ZIKV BR. O testículo dos animais IFNAR^{-/-} infectados com a ZIKV PO apresentaram uma redução na expressão da proteína PGK1 (Figura 22 A e B), e GLUT3 (Figura 22 A e E), quando comparados ao homogeneizado do testículo de animais não infectados. Entretanto a infecção pelo ZIKV PO não apresentou nenhuma alteração significativa estatística na expressão de Hexoquinase I (Figura 22 A e F) como vimos nos animais imunocompetentes. Não identificamos alterações na abundância de PGK2 (Figura A e C). Além disso, a expressão de GLUT2 (Figura 22 A e D), apresentou-se aumentada no testículo de animais infectados com ZIKV PO quando comparados aos animais não infectados.

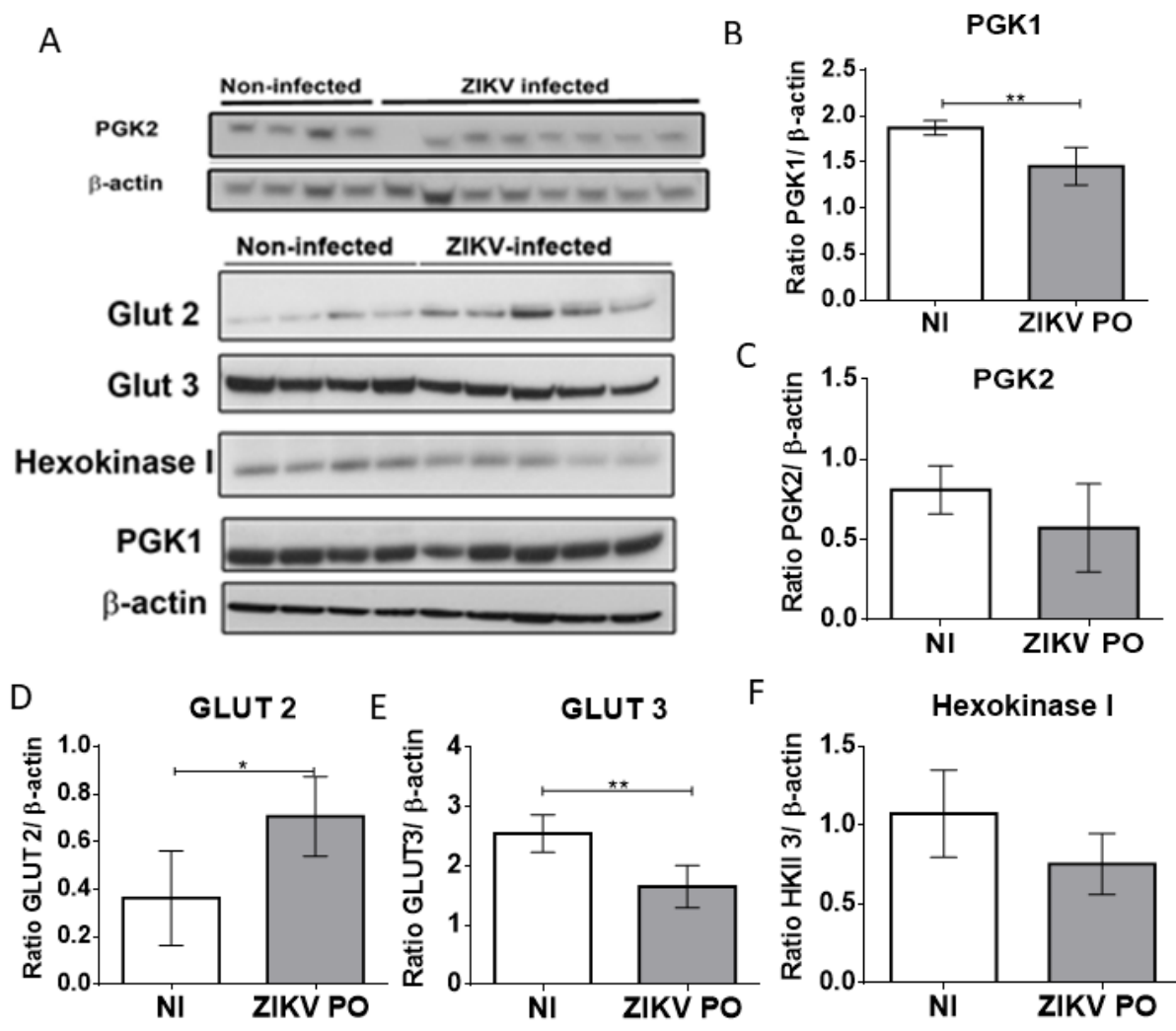


Figura 22. Modulação da expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica pela infecção por ZIKV PO no testículo de camundongos imunocomprometidos. Camundongos *IFNAR^{-/-}* foram infectados com ZIKV PO e tiveram o testículo coletado e homogeneizado e consequentemente as proteínas foram extraídas. Foram analisadas por Western Blot as proteínas: PGK2, PGK1, Hexoquinase I, Glut 2, Glut 3 e β-actina (A). Foi verificada a razão entre as proteínas de interesse e a β-actina por densitometria utilizando o software ImageJ. (*) significa $p < 0.05$, pelo teste Mann-Whitney.

Nossos dados demonstram que a abundância de algumas proteínas e metabólitos da via glicolítica são modulados pela infecção do ZIKV em testículo de camundongos. A proteína fosfoglicerato quinase foi modulada em todos os modelos animais pelas cepas ZIKV BR e ZIKV PO e outras proteínas envolvidas na glicólise, são de fato moduladas durante a infecção pelo ZIKV. Nossos dados também demonstram que o ZIKV modula o perfil metabólico do testículo. Este projeto suporta a hipótese de que o dano incorrido pela infecção de ZIKV no testículo pode estar correlacionado à modulação da via glicolítica e diversos metabólitos presentes em vias relacionadas ao metabolismo energético (Figura 23).

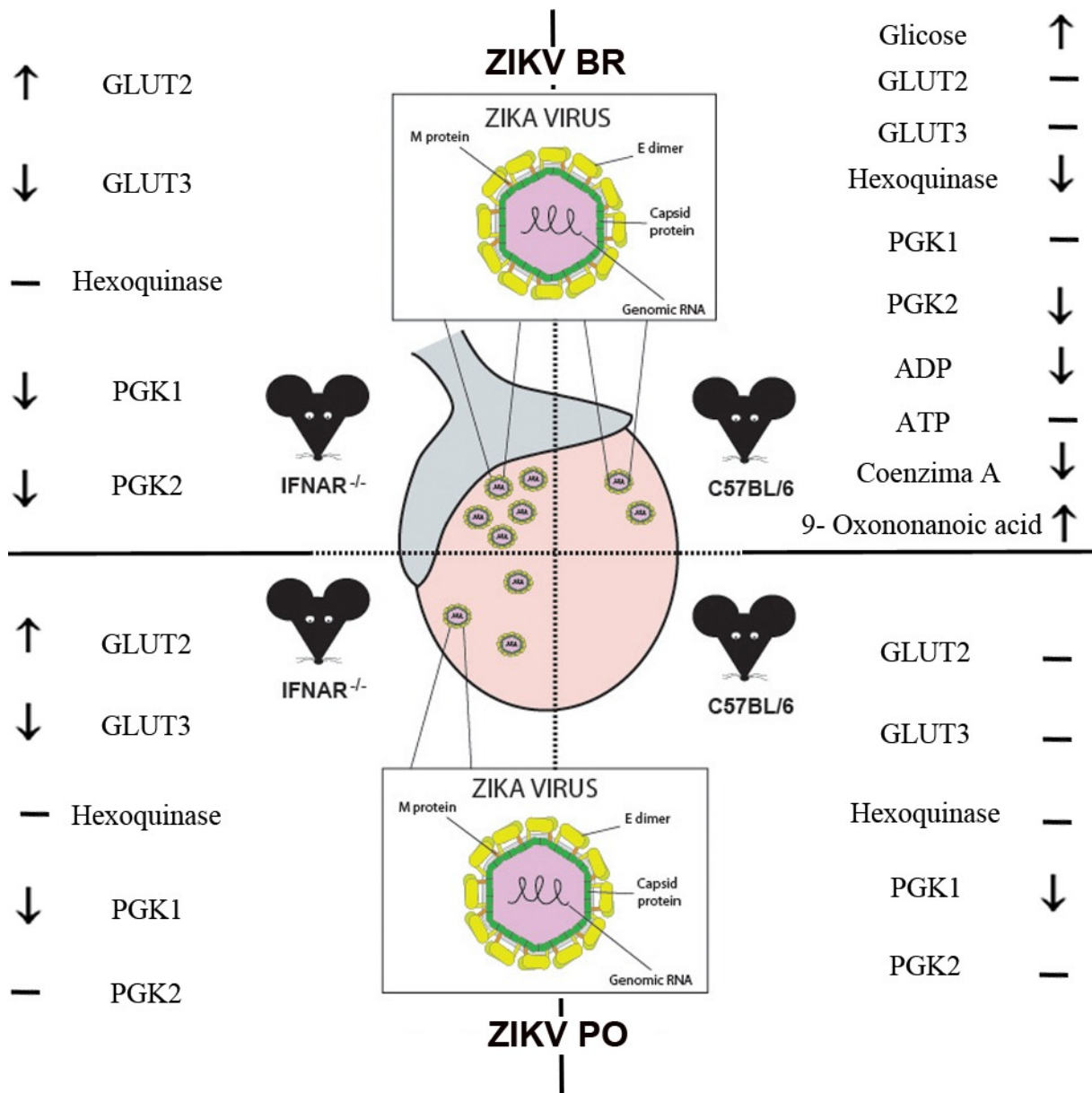


Figura 23. Modelo resumindo a modulação de moléculas da via glicolítica na infecção por ZIKV BR e ZIKV PO em testículo de animais imunocompetentes e imunocomprometidos.

5.6 Efeitos da infecção por ZIKV PO no testículo de animais imunocomprometidos em um longo período de infecção.

Muitas evidências sobre a transmissão sexual do ZIKV entre homens e mulheres foram reportadas sendo então encontrado RNA viral no sêmen (HILLS et al., 2016; NICASTRI et al., 2016; SLAVOV et al., 2016). Foi demonstrado que as células germinativas masculinas (CGs) suportam a replicação do ZIKV. CGs são susceptíveis ao ZIKV e produzem altos níveis de partícula viral infecciosa (ROBINSON et al., 2018). Alguns trabalhos mostraram o material genético viral no testículo após um longo período da infecção, sugerindo que as células testiculares, incluindo CGs, têm um papel em potencial para o suporte e propagação do ZIKV (CLANCY et al., 2019; NICASTRI et al., 2016; ROBINSON et al., 2018; STASSEN et al., 2018). Clancy e colaboradores mostraram que a infecção em fase aguda resulta em vírus infeccioso capaz de ser transmitido sexualmente, porém, após 35 e 70 dias de infecção eles evidenciaram redução testicular seguida de orquite fibrosa severa (Orquite em último estágio). Sugerindo que mesmo após a fase aguda e com ausência do material genético viral, algumas consequências da infecção podem ser evidenciadas no testículo de animais IFNAR^{-/-} (CLANCY et al., 2019).

Tendo em vista isso todos esses fatores, decidimos verificar se as proteínas da via glicolítica permaneceriam moduladas pelo ZIKV PO em uma infecção de longo período. Com isso, infectamos animais IFNAR^{-/-} com a cepa ZIKV PO e após 28 e 183 dias após a infecção coletamos o testículo e analisamos o tamanho testicular e as proteínas da via glicolítica. Inicialmente, avaliamos a carga viral no soro dos animais do dia 2 após a infecção até o dia 28. Detectamos que a partir do dia 8 há uma redução significativa da carga viral no soro dos animais, mas ainda sendo detectada carga viral no dia 28 após a infecção (Figura 24 A). Fomos então avaliar se o período longo de infecção poderia influenciar nas características gerais do testículo. Observamos que após 28 dias de infecção não há alteração quanto ao peso do testículo entre os animais infectados e não infectados, porém o testículo esquerdo dos animais infectados com ZIKV após 183 dias de infecção apresentaram uma redução do peso quando comparado aos animais infectados com 28 dias de infecção (Figura 24 B). Notamos ainda que a largura do testículo esquerdo dos camundongos infectados com ZIKV PO durante 183 dias apresentou uma redução quando comparado ao testículo dos animais que tinham apenas 28 dias de infecção (Figura 24 C), diferentemente do comprimento que não apresentou nenhuma alteração entre os grupos (Figura 24 D). Por fim, observamos que tanto a largura (Figura 24 E) quanto o

comprimento (Figura 24 F) do testículo direito dos camundongos infectados durante 183 dias apresentaram redução significativa quando comparados aos animais infectados durante 28 dias.

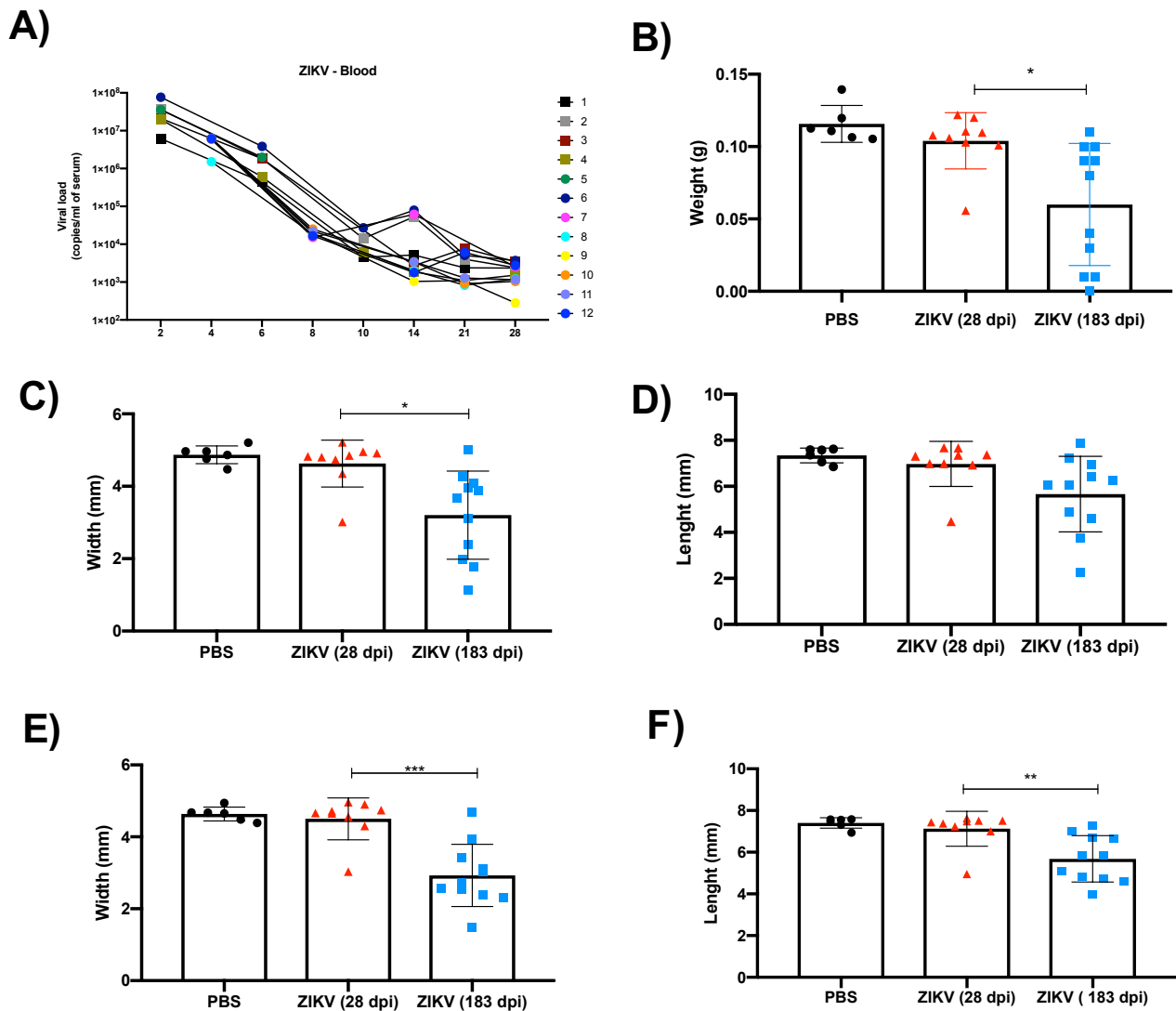


Figura 24. Peso do testículo dos animais infectados por longo período apresentou uma redução significativa de tamanho quando comparado aos animais no período de infecção de 28 dias. Animais IFNAR^{-/-} foram infectados com ZIKV PO durante os 183 dias de infecção foi verificado a carga viral no sangue (A), o peso dos testículos (B), largura (C e E) e comprimento (D e F) do testículo direito e esquerdo. PBS: animal não infectado. (*) significa $p < 0.05$, pelo teste anova com múltiplas comparações.

Com o intuito de avaliar se o ZIKV poderia influenciar a via glicolítica no testículo de camundongos após um longo tempo de infecção. Avaliamos por Western Blot as proteínas PGK1, PGK2, Hexoquinase 1, GLUT2 e GLUT3. Verificamos que apesar de alguns animais não apresentarem expressão de PGK2, não há diferença significativa na sua abundância no testículo dos animais não infectados e infectados com ZIKV após 183 dias de infecção (Figura 25 A e B). O mesmo acontece com a expressão das proteínas PGK1 (Figura 25 A e B) e GLUT3 (Figura 25 A e E), apesar de apresentar uma aparente redução nos animais infectados com 183 dias, não há diferença significativa entre os grupos. Porém, a expressão de GLUT2, assim como nos animais com período de infecção de 14 dias (Figura 22 A e D), foi significativamente maior no testículo de camundongos infectados quando comparados aos não infectados (Figura 25 A e D). De forma oposta, a expressão da proteína Hexoquinase, apresentou redução no grupo dos animais infectados quando comparados aos animais não infectados (Figura 25 A e F).

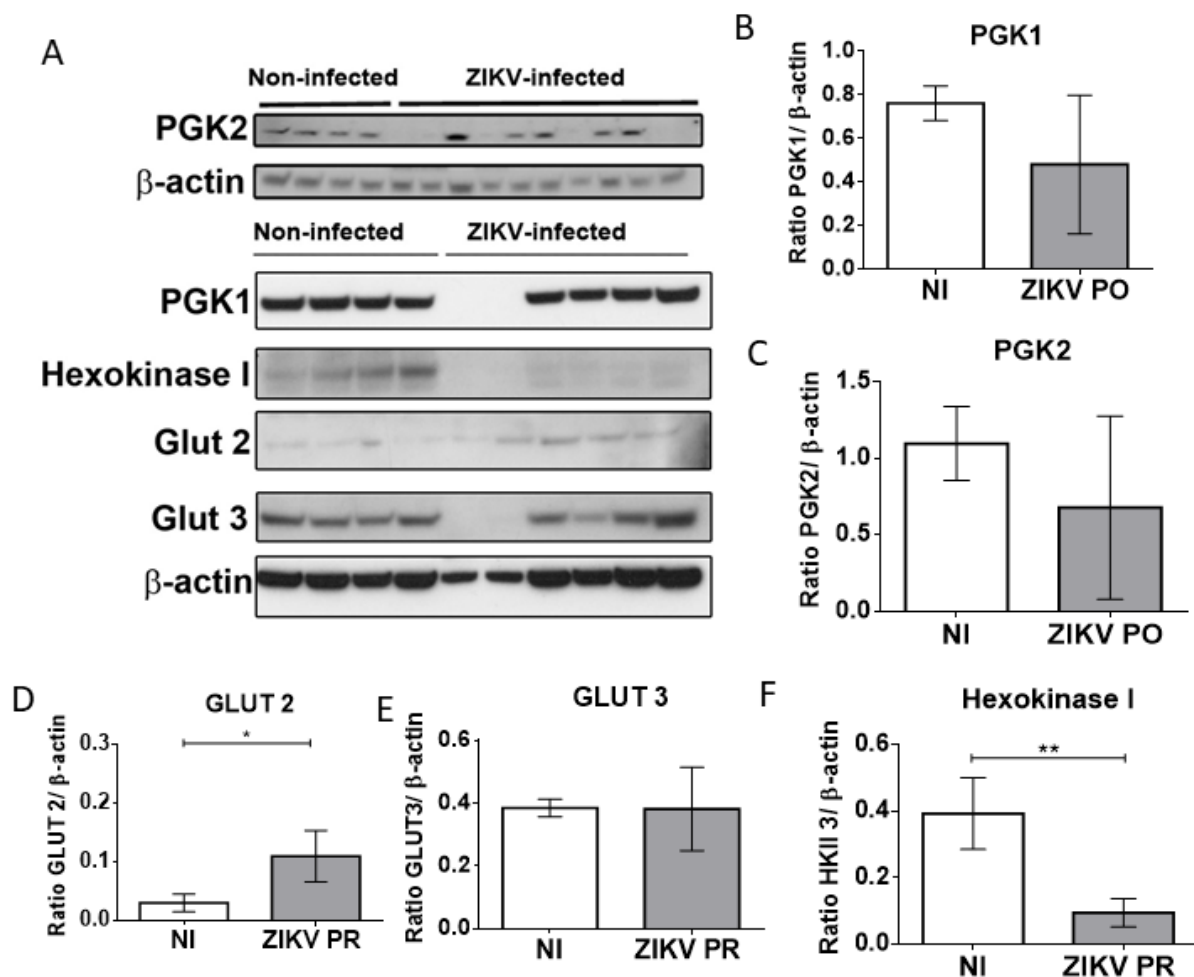


Figura 25. Modulação expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo da glicose pela infecção por ZIKV PO no testículo de animais imunocomprometidos infectados com 183 dias. Camundongos IFNAR^{-/-} foram infectados com ZIKV PO e tiveram o testículo coletado e homogeneizado e conseqüentemente as proteínas foram extraídas. Foram analisadas por Western Blot as proteínas: PGK2, PGK1, Hexoquinase I, Glut 2, Glut 3 e β -actina (A). Foi verificada a razão entre as proteínas de interesse e a β -actina por densitometria utilizando o software ImageJ. (*) significa $p < 0.05$, pelo teste Mann-Whitney.

Quando nos deparamos com diminuição de abundância de proteínas em alguns animais, porém a expressão normal de β -actina, decidimos investigar o que poderia estar acontecendo. Primeiramente, identificamos por SDS-page corado com *Coomassie Blue* que havia um padrão diferencial das proteínas entre as amostras provindas dos homogeneizados de tecido de camundongo com período de infecção de 183 dias (Figura 26 B) e também quando comparados aos animais com período de infecção de 14 dias (Figura 26 A).

Com isso, dividimos a os animais em dois grupos, nomeamos de grupo 1 os animais que apresentavam um perfil de proteínas esperado (comparado ao homogeneizado de testículo de animais que haviam 14 dias de infecção), e nomeamos de grupo 2 os animais que apresentaram um perfil proteico diferencial no SDS-page e também que apresentou ausência de proteínas da via glicolítica, porém expressão normal de β -actina.

Após assumir os dois grupos diferentes, identificamos que o grupo 2 apresentou tamanho e comprimento do testículo significativamente menor que o grupo 1 (Figura 26 C e D). Para o próximo passo, verificamos que o diferencial entre os dois grupos eram o aparecimento de uma banda muito grande na altura de 60kda e no restante do gel ausência de um perfil normal de migração. Para identificar qual proteína poderia estar superabundante cortamos a área do gel que equivalia a banda com grandes quantidades de proteínas (cerca de 60kda do grupo 2, selecionadas em vermelho na Figura 26 B). Decidimos cortar 4 bandas de diferentes animais do grupo 2 e apenas 1 do grupo 1 apenas para servir de comparativo. Fizemos então a análise por MS/MS para identificar qual proteína poderia estar sendo modulada, sendo superabundante nas condições citadas acima. Com isso identificamos que, os animais do grupo 2 possuem menor abundância de proteínas como: Glucose-1,6 bifosfato sintase, Acetyl-coezyma A (Figura 26 E). Porém, gostaríamos de saber qual proteína estava mais abundante nesses animais e identificamos que os animais do grupo 2 apresentam uma maior quantidade de Albumina Sérica e Transferrina sérica do que o homogeneizado do testículo do grupo 01 (Figura 26 G). Além disso foram identificadas várias outras proteínas que estão sendo aumentadas no grupo 2 como, Plastina, e proteína do sistema complemento, porém em menor quantidade quando comparada a Albumina Sérica (Figura 26 G e H).

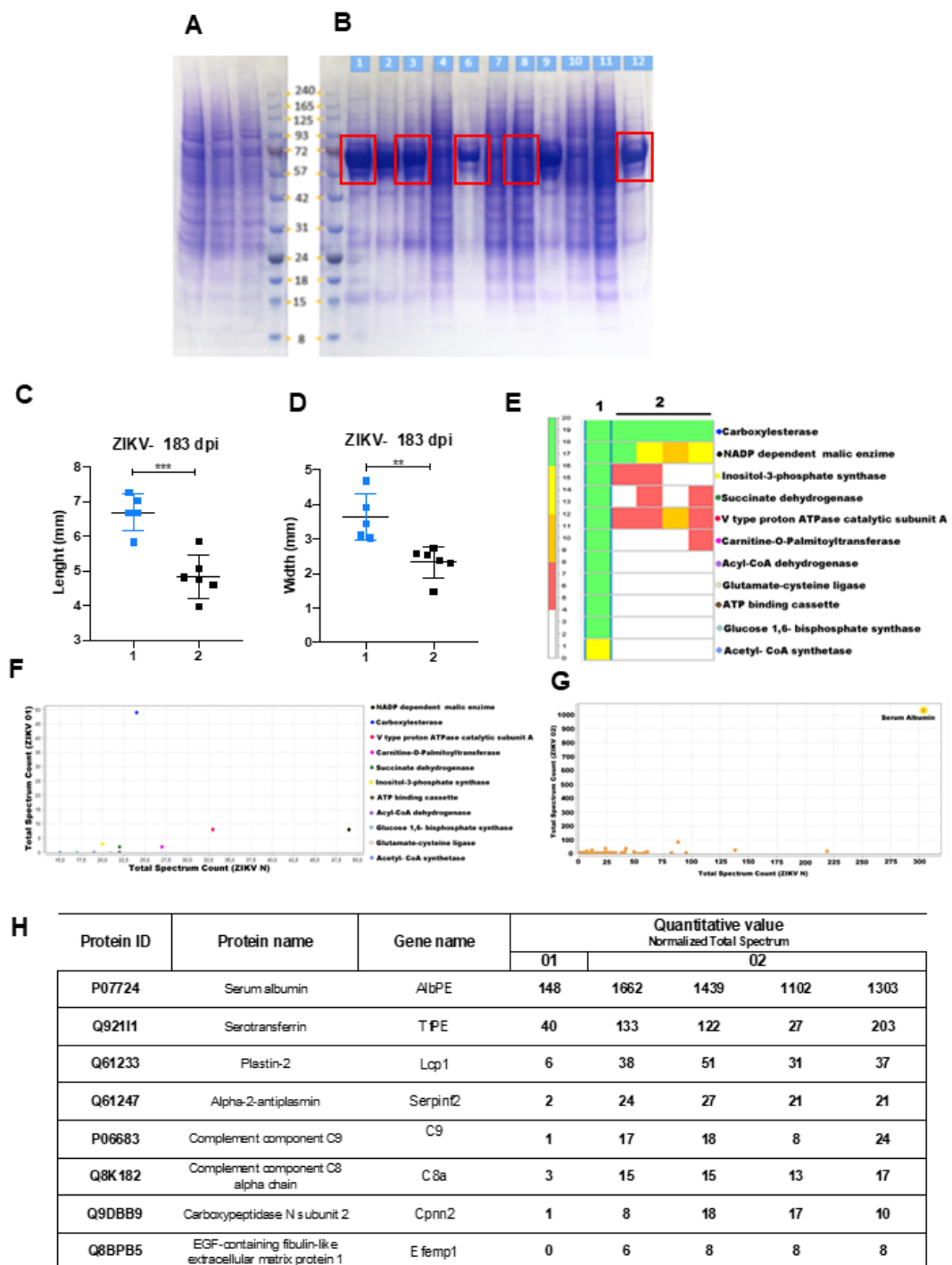


Figura 26. Análise morfológica e proteômica dos testículos de animais imunocomprometidos infectados com ZIKV PO após 183 dias. (A) Gel de poliacrilamida corado com *Coomassie blue* mostrando as proteínas provenientes de homogeneizado de testículo dos animais infectados com ZIKV após 28 dias de infecção (B) Gel de poliacrilamida corado com *Coomassie blue* mostrando as proteínas provenientes de homogeneizado de testículo de animais infectados com ZIKV após 183 dias de infecção. Animais infectados por

ZIKV após 183 dias de infecção foram divididos em grupo 1 e 2 e avaliados o comprimento (C) e a largura (D) dos testículos. Além da análise proteômica gerada pelo programa Scaffold a partir dos testículos dos animais infectados após 183 dias de infecção, mapa de calor (E), Contagem de espectro total (F e G) e a lista das proteínas mais abundantes (H).

5.7 Análise Físico-química e Microscópica do espermatozoide dos pacientes

Primeiramente avaliamos a idade dos pacientes e verificamos que a média de idade dos pacientes controle (negativo para a infecção com ZIKV) é de 23,5 anos e a média de idade dos pacientes que foram previamente infectados com ZIKV é de 34 anos (Tabela 4). Ao analisarmos as características físico-químicas do sêmen, verificamos que não houve diferença de cor, pH, viscosidade e aspecto normais e presença de coágulo seminal após a ejaculação entre os grupos controle e infectado. A avaliação do volume ejaculado mostrou que não houve diferença significativa entre os pacientes do grupo controle e os pacientes infectados, porém tivemos apenas um voluntário ZIKV positivo que apresentou hipospermia, que ocorre quando o volume de sêmen ejaculado é abaixo de 1,5 ml, sendo que o valor de referência é de 1,5 a 5,0ml. Quanto ao tempo de liquefação, não houve diferença entre os grupos, onde todos os voluntários apresentaram tempos de liquefação do sêmen dentro da normalidade que são de 5 a 30 minutos (Tabela 4). Quanto a análise microscópica, verificamos que embora haja diferença significativa entre o grupo controle o grupo ZIKV positivo, um voluntário foi diagnosticado com oligozoospermia leve, que ocorre quando a concentração está entre 5,0 milhões/ml e 14,9 milhões/ml. Outro parâmetro de análise é o número de espermatozoides por volume ejaculado, onde também não houve diferença significativa entre o grupo ZIKV positivo e o grupo controle. Entretanto, dois voluntários ZIKV positivo apresentaram esse parâmetro abaixo do valor de referência. Esses resultados mostraram que existe uma diferença aparente, porém não significativa entre os grupos saudáveis e os infectados, sendo os infectados apresentando redução na concentração de espermatozoides por mL, o que precisa ser confirmado posteriormente com a aquisição de novos voluntários e o aumento do n amostral (Tabela 4).

	Dados Individuais	Média	Desvio Padrão	Valor de p
Faixa Etária (anos)				
Controle	4	23,5	0,58	-
ZIKA	4	34	7,57	-
Volume do Ejaculado (ml)				
Controle	3	2,675	2,39	0,7143
ZIKA	4	3,733	1,97	
Tempo de liquefação (min)				
Controle	3	24,75	3,86	0,9714
ZIKA	4	25,67	4,93	
Concentração de espermatozoide por ml (milhões/ml)				
Controle	3	31	7,41	0,61
ZIKA	4	21,5	13,08	
Número de espermatozoide por volume ejaculado				
Controle	3	104,133	31,47	0,4
ZIKA	4	57,52	57,52	

Tabela 05. Características gerais e físico-químicas dos espermatozoides dos pacientes.

Análise estatística feita por teste de Mann-Whitney.

5.7.2. Análise de morfológica e de motilidade dos espermatozoides dos pacientes

A análise de motilidade é composta por três parâmetros, a motilidade progressiva que é a capacidade o espermatozoide se mover um uma direção, a motilidade não progressiva que é a capacidade de o espermatozoide mover a cauda, mas não sair do lugar e a imobilidade, onde o espermatozoide não se move. De modo geral todos os voluntários apresentaram uma boa taxa de espermatozoides viáveis, pois todos apresentaram níveis de mobilidade maior que 40%. Quando comparamos o grupo controle com o grupo Zika positivo não observamos diferença entre a porcentagem de espermatozoides que se movem progressivamente (MP) e nenhum voluntário apresentou níveis abaixo do valor de referencia que é 32% dos espermatozoides. O mesmo ocorreu para a mobilidade não progressiva (MNP) e a taxa de espermatozoides imóveis (Figura 26 A).

A análise morfológica é composta por cinco parâmetros: a forma normal do espermatozoide, a forma amorfa dos espermatozoides, as anomalias na cabeça, a parte intermediária e a cauda. De modo geral todos os voluntários apresentaram espermatozoides viáveis com morfologia normais acima de 30%, e apenas 1% de espermatozoides amorfos. Quando comparamos o grupo controle com o grupo ZIKV positivo não observamos diferença entre a porcentagem de espermatozoides normais. O mesmo ocorreu para as taxas de anomalia na cabeça, anomalia na parte intermediária, e anomalias na cauda dos espermatozoides (Figura 26 B).

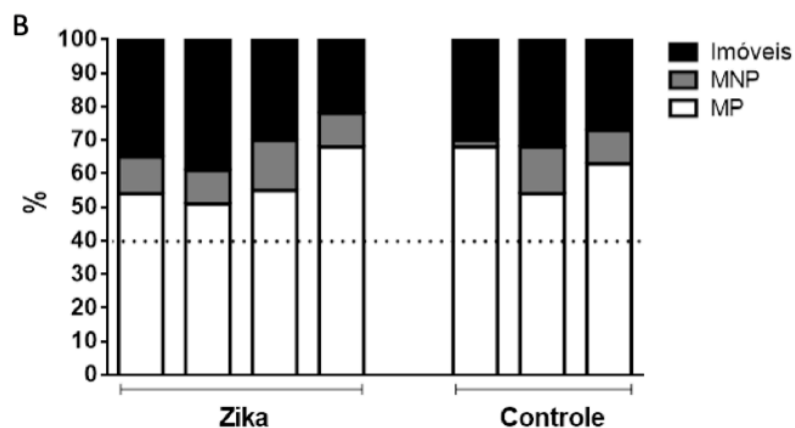
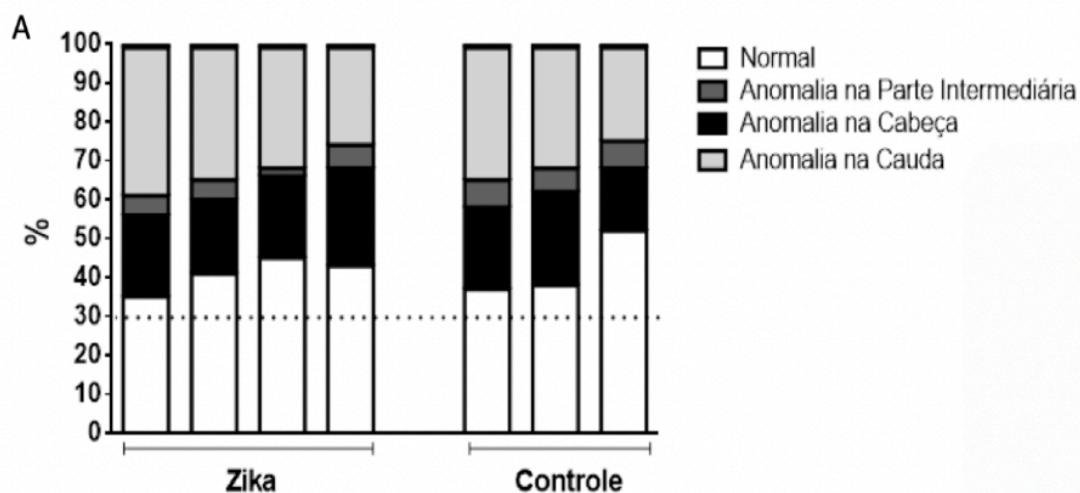


Figura 27. Análise morfológica e de motilidade dos espermatozoides dos pacientes. Análise geral da morfologia dos espermatozoides, onde a forma normal dos espermatozoides tem que ser maior ou igual a 30% (A). Análise geral da motilidade dos espermatozoides, onde a motilidade progressiva (MP) mais a motilidade não progressiva (MNP) tem que ser maior ou igual a 40% (B). (*) significa $p < 0.05$, pelo teste Kruskal-Wallis .

5.8 Análise proteômica do sêmen dos pacientes infectados com ZIKV

Infertilidade tem sido um problema atual que afeta aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva (INHORN; PATRIZIO, 2014). Porém, na maioria dos casos de infertilidade os defeitos moleculares responsáveis pelo diagnóstico permanecem desconhecidos (KRAUSZ; ESCAMILLA; CHIANESE, 2015). Com isso as técnicas de High-throughput, incluindo genômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica têm sido grandes apostas como ferramentas para o estudo da infertilidade, no que tange à produção e maturação de espermatozoides, para descobrimento de novos marcadores moleculares (BIENIEK; DRABOVICH; LO, 2016; JODAR; SOLER-VENTURA; OLIVA, 2017). Dentre todos esses níveis, as proteínas merecem um destaque diferencial tendo em vista que desempenham a maioria das funções efetoras das células.

Tendo em vista esses fatores e que ainda existem algumas evidências que a infecção por ZIKV pode causar infertilidade em humanos, decidimos utilizar esperma de pacientes infectados e não infectados com ZIKV em análise de proteômica no modo *Label-free*. Após as análises verificamos que 4081 proteínas foram identificadas, 2892 proteínas quantificadas (mostradas no mapa de calor) (Figura 27 A). Porém para ser significativa e diferencialmente no esperma de pacientes infectados e não infectados, uma proteína tem que ter um valor de p ajustado menor que 0,05 e um escore z inferior a -1,96 ou superior a 1,96. Com isso foram encontradas 47 proteínas estatisticamente significantes (Figura 27 C). Tomados em conjunto esses dados preliminares mostram que mesmo em fase crônica os pacientes infectados com ZIKV apresentam um perfil proteômico diferente dos pacientes saudáveis. Mesmo com a necessidade de um maior n amostral algumas proteínas apresentam abundância diferencial após a infecção, podendo ser um futuro alvo farmacológico.

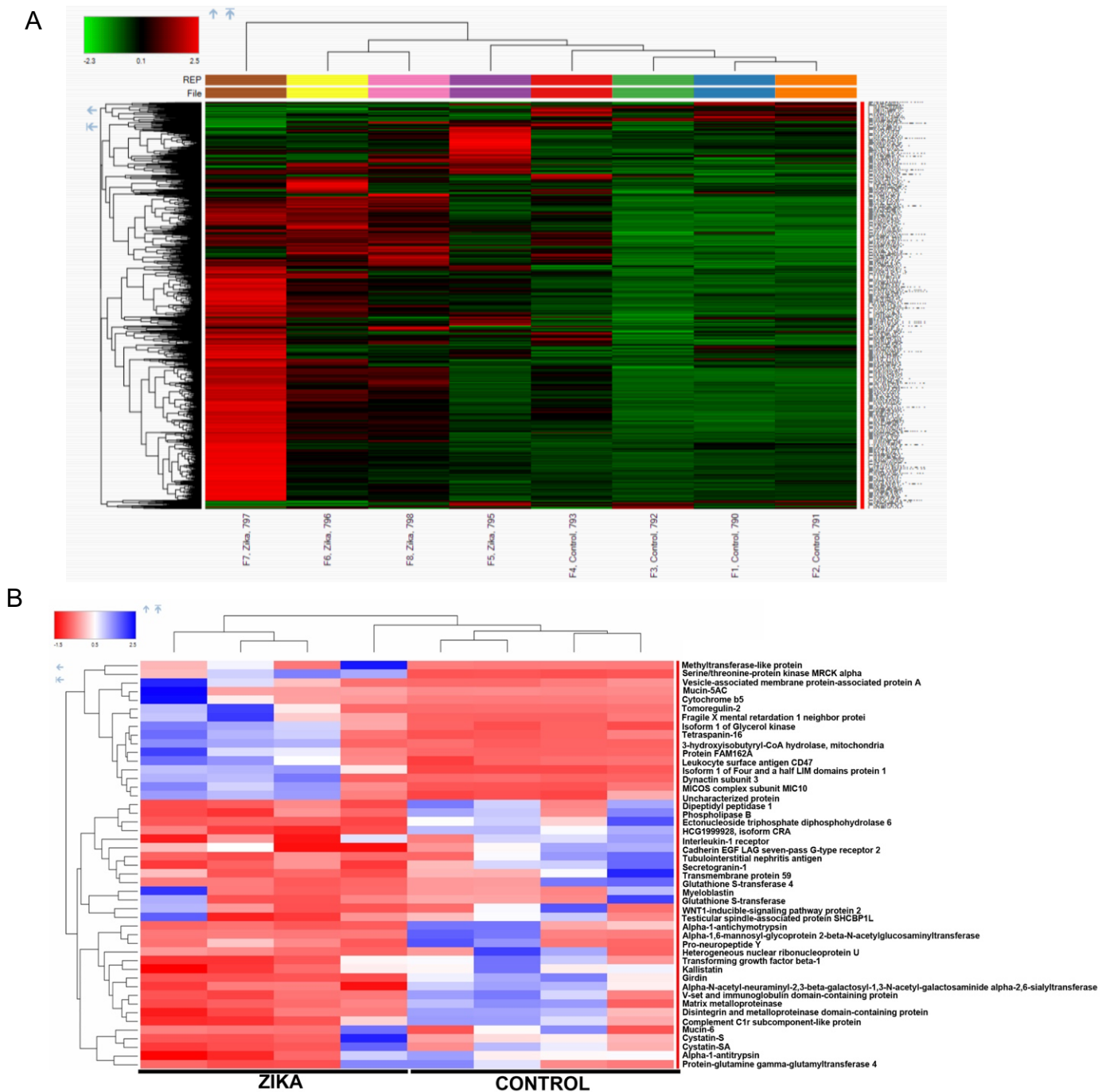


Figura 28. Mapa de calor da análise proteômica do sêmen de pacientes infectados com **ZIKV**. LC MS/MS foi realizado e após a identificação de 4081 proteínas, 2892 proteínas quantificadas (A). 47 proteínas estatisticamente significante entre as amostras (B). As proteínas com um valor de p ajustado menor que 0,05 e um escore z inferior a -1,96 ou superior a 1,96.

6. Discussão

Após uma pausa prolongada das epidemias, o ZIKV foi encontrado nas Ilhas do Pacífico. Em seguida, em 2015, foi confirmado que estava circulando ativamente no Brasil, até se espalhar por toda América (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019). Com esse surto, iniciaram as especulações entre a associação da infecção viral com defeitos congênitos, síndromes neurológicas e transmissão sexual; e posteriormente veio o entendimento das rotas de transmissão da doença, espectro clínico e patológico e as possíveis complicações que estão associadas a infecção (AGUMADU; RAMPHUL, 2018).

Alguns estudos mostraram que o ZIKV pode ser encontrado em células, fluidos e tecidos que não foram descritos anteriormente em seres humanos, como na saliva e na urina (BONALDO et al., 2016; LAMB et al., 2018). Diferentemente da maioria dos flavivírus, que são transmitidos quase que exclusivamente por vetores, a transmissão sexual do ZIKV tem sido identificada e estima-se que compreende de 3 a 23% das infecções (FOY et al., 2011; HILLS et al., 2016; RNA et al., 2016; TOWERS et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Com isso, o mundo voltou sua atenção quanto à saúde pública internacional para esse vírus, estimulando um rápido entendimento da patogênese, isolando e sequenciando diversas cepas, aumentando o investimento para desenvolvimento de vacinas e alvos terapêuticos (ALMEIDA et al., 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Assim, começou-se a usar diferentes modelos animais para compreensão dos mecanismos de patogênese da infecção pelo ZIKV (DONG; LIANG, 2018).

Alguns modelos de camundongos já foram bem estabelecidos para o estudo dos mecanismos de disseminação do vírus, patogênese, resposta imune do hospedeiro, fertilidade, fetos em desenvolvimento, utilização de terapias, vacinas e controle da infecção (GORMAN et al., 2019; MORRISON; DIAMOND, 2017). Camundongos que apresentam deficiência genética nas vias de sinalização do Interferon tipo I (IFN), apresentam uma maior susceptibilidade à infecção pelo ZIKV (MORRISON; DIAMOND, 2017). Algumas análises bioquímicas em humanos, mostraram que o ZIKV antagoniza a resposta do IFN humano, através da proteína NS5, promovendo a degradação de STAT2 e levando a uma diminuição de IFN. Porém, em camundongos (C57BL/6), a NS5 do ZIKV não é capaz de degradar STAT2, sendo então uma das explicações do porque estes camundongos são imunocompetentes e geralmente são resistentes às infecções e à doença promovida pelo ZIKV (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016).

Além do entendimento dos melhores modelos animais para estudo da patogênese, o ressurgimento e expansão geográfica do ZIKV culminou com a necessidade de identificação das cepas virais para o entendimento da patogênese e virulência que levou a caracterização de muitas cepas virais (SHRIVASTAVA et al., 2018). Com isso, as duas cepas virais (ZIKV BR e ZIKV PO) utilizados nesse trabalho foram isoladas no surto epidêmico de 2015 e a caracterização dessas cepas indicou que elas pertencentes filogeneticamente ao clado da cepa asiática. Dados filogenéticos mostraram que durante a epidemia nas Américas a cepa Asiática era a majoritariamente circulante (HU et al., 2019).

Alguns estudos comparativos entre os isolados demonstraram que os isolados Africanos apresentam maior virulência e mortalidade enquanto que algumas cepas asiáticas possuem a característica de desenvolver a doença na sua forma crônica (ESSER-NOBIS et al., 2019; VIELLE et al., 2018). Além dos efeitos diferenciais promovidos pela infecção das duas cepas no hospedeiro, ZIKV BR e ZIKV PO, verificamos que as duas cepas apresentam alta homologia, com o total de 39 sequências nucleotídicas diferenciais entre as duas cepas resultando em 9 substituições de aminoácidos. Porém, há um indicativo de que uma mutação ocorrida no resíduo 122 na proteína NS1 possa ter um papel importante na capacidade de induzir virulência. Contudo, esse ponto deve ser posteriormente investigado.

A proteína NS1 é de extrema importância na interação do vírus com o hospedeiro, desempenhando um importante papel na replicação viral, patogênese e evasão imunológica (ALAYLI; SCHOLLE, 2016; AVIRUTNAN et al., 2010; KYUNG et al., 2006). Essa proteína apresenta uma loop com uma porção hidrofóbica no domínio da proteína que pode contribuir com a associação à membrana celular do hospedeiro (XU et al., 2016). Essa região pode ser variável em alguns flavivírus, porém é uma região hidrofóbica ou carregada positivamente, o que favorece a ligação viral à membrana celular (SONG et al., 2016; XU et al., 2016). Nesse loop há resíduos já descritos como essenciais para a associação com a membrana, como os resíduos 122, 123 e 124 (HILGENFELD; VASUDEVAN, 2018). Nos nossos resultados verificamos que resíduo 122 na proteína NS1 da cepa ZIKV BR é uma histidina, um aminoácido polar básico, e na cepa ZIKV PO é uma tirosina aminoácido polar neutro. Assim, essa mutação pode ser um indicativo de maior patogênese de ZIKV BR.

Alguns estudos mostraram que os animais selvagens da linhagem C57BL/6 com 4-6 semanas não desenvolveram sinais clínicos aparentes que caracterizam doença, esses animais apresentaram somente uma carga viral muito baixa comparado aos animais deficientes para Interferon (MORRISON; DIAMOND, 2017). Porém os animais sem componentes-chave da imunidade antiviral inata, como os da via do Interferon, sucumbiram à infecção por diferentes

isolados, além da carga viral ter sido identificada em diferentes órgãos e tecidos (ALIOTA et al., 2016; TANG et al., 2016; ZHANG et al., 2018).

Para uma compreensão mecanicista da patogênese do ZIKV, animais imunocomprometidos (IFNAR^{-/-}) e imunocompetentes (C57BL/6) foram infectados e então, avaliamos primeiramente a condição geral dos animais pós-infecção. Verificamos que os animais imunocomprometidos infectados com isolado brasileiro apresentaram uma redução significativa do peso quando comparados aos animais não infectados. Porém, não identificamos o mesmo fenômeno para o isolado de Porto Rico. Além disso, verificamos que os animais IFNAR^{-/-} infectados por ZIKV BR apresentaram uma maior carga viral no decorrer da infecção do que os animais infectados com ZIKV PO, sendo assim um primeiro indicativo que a cepa ZIKV BR poderia estar desenvolvendo maior patogênese. E também verificamos que apenas um animal imunocomprometido infectado com a cepa ZIKV BR morreu, indicando também maior letalidade dessa cepa. Como esperado, baseado em dados da literatura verificamos que os animais imunocompetentes foram capazes de sanar a infecção por ZIKV, não sendo detectada carga viral no plasma de animais imunocompetentes, como já demonstrado por alguns autores (GORMAN et al., 2019; MORRISON; DIAMOND, 2017). Porém um importante achado do trabalho foi a carga viral diferencial dos dois isolados nos órgãos. Desde as primeiras análises sempre verificamos que aparentemente a infecção pelo isolado brasileiro apresenta maior carga viral do que o isolado de Porto Rico no plasma de animais imunocomprometidos. Desta forma, foi importante investigar melhor a patogênese da infecção pelo ZIKV dos diferentes isolados.

A patogênese da infecção pelo ZIKV tem sido fortemente relacionada a doenças neurológicas e efeitos no trato reprodutor masculino (HILLS et al., 2016; MORRISON; DIAMOND, 2017; MUÑOZ et al., 2017; WEN; SONG; MING, 2017). O ZIKV pode persistir em locais com imunidade privilegiada, como o cérebro e o testículo (SHAO et al., 2017; TSETSARKIN et al., 2018; WINKLER et al., 2017). O ZIKV persiste no trato reprodutivo masculino, com vírus infecciosos e RNA viral sendo isolados até 69 e 188 dias após o início dos sintomas, respectivamente (NICASTRI et al., 2016). Nossos dados de PCR em tempo real sugerem que o cérebro de animais IFNAR^{-/-} apresentaram a replicação das duas cepas virais, diferentemente do cérebro dos animais imunocompetentes que não apresentaram material genético viral após a infecção.

Na busca por identificar a correlação da permanência do ZIKV no testículo, verificamos que os animais IFNAR^{-/-} infectados com a cepa ZIKV BR apresentaram uma maior carga viral dos que os infectados com a cepa que foi isolada em Porto Rico. Além disso, um grande achado

do trabalho foi que após 14 dias de infecção não foi encontrada nenhuma carga viral no plasma de animais imunocompetentes. Porém, foi encontrada carga viral no testículo, mostrando que esse órgão é capaz de suportar a replicação viral do isolado brasileiro e que esse vírus pode apresentar tropismo para esse órgão. Esse dado corrobora com a que há na literatura, onde foi evidenciado que ZIKV pode ser encontrado nos fluidos seminais mesmo após muito tempo da resolução da viremia (JOGUET et al., 2017).

Identificamos carga viral no testículo de animais imunocompetentes e imunocomprometidos infectados pela cepa ZIKV BR. Entretanto, avaliamos que apenas as dimensões dos testículos de animais imunocomprometidos permaneceram alteradas e não observamos diferença no peso do testículo. Uma das nossas hipóteses, é que mesmo apresentando carga viral, provavelmente o tempo da infecção não foi suficiente para identificarmos danos macroscópicos significativos no testículo.

O ZIKV pode permanecer no sêmen até seis meses após a infecção e a infecção pode promover danos testiculares evidentes (DE LA VEGA et al., 2019; NICASTRI et al., 2016; URAKI et al., 2017). Em modelo animal de animais tratados com anticorpo monoclonal bloqueador anti-Ifnar1 foi verificado que a infecção consegue desenvolver atrofia testicular, níveis baixos de testosterona além de oligospermia (GOVERO et al., 2016; URAKI et al., 2017). Um estudo em humanos ainda evidenciou uma redução transitória na contagem de espermatozoide na fase aguda da infecção (JOGUET et al., 2017). A infecção ZIKV pode provocar danos testiculares e no epidídimo, levando à redução de hormônios sexuais, destruição de células somáticas e principalmente modulando e infectando células de Sertoli (KUMAR et al., 2018; MATUSALI et al., 2018; SHENG et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que em animais imunocomprometidos a concentração e motilidade de espermatozoides foram comprometidas pela infecção (GOVERO et al., 2016). Fomos verificar se em animais imunocomprometidos a cepa viral que chega e permanece no testículo (ZIKV BR) poderia modular esses mesmos parâmetros de fertilidade. Verificamos que a concentração espermática do epidídimo esquerdo e direito permanece não alterada pela infecção. Porém, identificamos que a mobilidade progressiva, percentual de espermatozoides móveis e também a porcentagem de espermatozoides normais, foram reduzidos pela infecção pelo ZIKV. Esse dado sugere que mesmo que a infecção não tenha alterado a quantidade de espermatozoides presentes no epidídimo, ela foi capaz de alterar a qualidade e normalidade dos espermatozoides, sendo um indício de promoção de infertilidade.

Foi demonstrado que ZIKV causa a morte celular de células testiculares, promovendo redução do tamanho do testículo, e podendo evoluir para orquite crônica (MATUSALI et al.,

2018). A inflamação testicular e a secreção de algumas citocinas podem desempenhar um papel danoso para a fertilidade, porém é importante ressaltar que algumas citocinas desempenham um importante papel para a homeostase testicular, além da participação nos processos inflamatórios (LOVELAND et al., 2017). A citocina IL-6 desempenha um importante papel na espermatogênese e a reestruturação das junções das células testiculares, precisando de uma regulação celular bem orquestrada para a homeostase testicular (GAN, 2014). A citocina IL-10, juntamente com a citocina TGF- β desempenham uma função crucial para a manutenção de um microambiente imunossupressivo no testículo (D'ORAZIO; NIEDERKORN, 1998; KEVIN RANGE, 2012). Além disso, a citocina IL-10 consegue desenvolver um papel protetor, reduzindo danos na lesão por reperfusão (OZTURK et al., 2014). Ademais, a citocina TGF- β influencia no desenvolvimento testicular e no controle da diferenciação das células germinativas (YOUNG; WAKITANI; LOVELAND, 2015). Nesse contexto, a citocina TNF- α é produzida por espermátides, espermatócitos e macrófagos testiculares tendo um papel crucial na reposta imunoregulatória e apoptose.(BAKER; REDDY, 1998; PACE et al., 1993) No caso da citocina IL-1 β alguns estudos apontam que pode ter efeitos de diminuição ou aumento de testosterona nas células de Leydig (HYDROXYLASE; EXPRESSION; BUCHANAN, 1992; LIN et al., 1991; WARREN DW, PASUPULETI V, LU Y, PLATLER BW, 1990). Porém, uma elevação dessas citocinas no testículo pode estar correlacionada a danos severos várias disfunções testiculares como torção testicular e orquite autoimune (LYSIAK, 2004).Fomos então avaliar o perfil inflamatório do testículo e do soro dos animais. Não encontramos nenhuma diferença significativa em nenhuma das citocinas avaliadas, sugerindo que mesmo apresentando carga viral, o testículo ainda não apresenta sinais de inflamação local.

Sem sinais de inflamação, a persistência viral no testículo pode ser associada ao fato do vírus conseguir reprogramar o perfil transcricional das células. Em micróglia foi demonstrado que o ZIKV induz a modulação de numerosos metabólitos envolvidos na diferenciação, regulação da apoptose, arquitetura do vírion e replicação viral (VIAL et al., 2018). De forma semelhante, o soro de pacientes infectados com ZIKV também apresentou perfil metabólico alterado quando comparado aos pacientes saudáveis (MELO et al., 2017). O ZIKV também modula o metaboloma celular cerebral favorecendo sua replicação (DABAJA et al., 2018; ROTHAN et al., 2018; TIWARI et al., 2017).

Semelhante ao cérebro, os testículos são um órgão de privilégio imunológico que são afetados pela infecção pelo ZIKV. Como verificamos que os animais imunocompetentes

conseguem suportar a infecção do ZIKV isolado brasileiro, avaliamos se havia alguma modulação metabólica no testículo desses animais. Nesse contexto, verificamos que de forma geral o ZIKV consegue modular o perfil metabólico no testículo e talvez esse seja o fator que está suportando a replicação viral nesse órgão. Além disso, identificamos, um total de 16.452 picos (íons únicos) em ionização positiva e 9.358 picos (íons únicos) em ionização negativa. Usando análise estatística, 154 e 25 desses picos foram considerados estatisticamente diferentes (p -valor $\leq 0,05$), entre amostras de testículo infectado e não infectado.

O ZIKV reprograma o metabolismo celular modulando a produção de energia via glicólise em alguns modelos neurológicos (BEYS-DA-SILVA et al., 2018; DABAJA et al., 2018). Vários trabalhos sugerem que a modulação do metabolismo celular, incluindo a glicólise, leva a distúrbios neurológicos, defeitos congênitos e malformação cerebral (BEYS-DA-SILVA et al., 2018; GILBERT-JARAMILLO et al., 2019). Nossos dados sugerem que o metabolismo da glicose também é modulado no testículo. Nossos dados mostraram que abundância relativa de glicose, foi maior nas amostras de testículos infectados quando comparado amostras não infectadas.

Além disso, Thaker e colaboradores mostraram que a infecção por ZIKV é capaz de reprogramar de forma diferencial os tipos celulares. Eles demonstraram que em células humanas a infecção promove uma alteração na razão AMP/ATP levando à fosforilação de AMPK que leva a ao aumento de Caspase-3, uma importante enzima indutora de morte celular por apoptose. Em contrapartida, em células de inseto a infecção não modula a razão AMP/ATP não havendo ativação das vias morte celular, o que permite a manutenção da sobrevivência celular. Essa seria uma das explicações de um dos mecanismos de persistência viral em células de inseto (THAKER et al., 2019), sendo também uma das explicações do porque o vírus persiste no trato reprodutor masculino, tendo em vista que em nossos achados não vimos aumento de AMP.

Além do AMP, verificamos que a infecção promoveu aumento de (2E)-4-Hydroperoxy-2-nonenal, um produto da peroxidação lipídica que é um dos maiores responsáveis por alguns efeitos citopatológicos durante o estresse oxidativo (SHIMOZU et al., 2011; UCHIDA, 2003). Além disso, verificamos aumento de L-Threoneopterin, um marcador de infecção viral, que é produzido por macrófagos após a estimulação com Interferon-gama (WIRLEITNER et al., 2005). Alguns autores demonstraram que o composto Neopterin pode influenciar no metabolismo redox das células e também pode impedir a ativação do inflamassoma em astrócitos (DE PAULA MARTINS et al., 2018; WIRLEITNER et al., 2005). Então tomados em conjunto, esses metabólitos modulados juntamente com os dados de inflamação denotam um microambiente mais oxidativo com as vias de inflamação inibidas.

Além desses metabólitos, verificamos a redução da abundância de Hexoses, Panthothenic acid, Coenzima A e ADP, indicando que a infecção pelo ZIKV pode estar modulando o metabolismo energético celular.

Na tentativa de identificar se a persistência viral no testículo poderia estar associada a modulação do metabolismo da glicose, verificamos se algumas proteínas da via glicolítica estariam sendo moduladas pela infecção por ZIKV, incluindo a proteína PGK2. PGK2, enzima responsável pela primeira etapa geradora de ATP na via glicólise, é apenas expressa no testículo e é considerada por alguns autores como um biomarcador de fertilidade devido ao seu papel na motilidade dos espermatozoides. Nossos dados preliminares demonstram que PGK2 e hexoquinase 1 são moduladas pela infecção pelo ZIKV. Essas proteínas estão envolvidas na glicólise, e foram de fato moduladas nos nossos experimentos durante a infecção pelo ZIKV BR em animais imunocompetentes e imunocomprometidos. Portanto, temos a hipótese de que essa modulação de PGK2 e hexoquinase 1 poderiam ter grande impacto para a geração de ATP. Porém, verificamos que não houve diferença na concentração de ATP gerado em testículos de animais infectados por ZIKV e não infectados. Desta forma, nossa hipótese é que a atividade de PGK1 ou modulação alostérica de PGK2 possam manter a concentração de ATP nos outros tipos celulares no testículo. A expressão de PGK1 é encontrada em todos os tecidos dos mamíferos, enquanto PGK2 é encontrada somente em células espermáticas pós-meióticas (KRAMER; ERICKSON, 1981). Como avaliamos o perfil geral do testículo, o nível de ATP pôde ser mantido nesse órgão.

A ausência de PGK2 impacta significativamente na mobilidade de espermatozoides (LIU et al., 2016, 2019). Verificamos que a abundância da proteína PGK2 é reduzida após a infecção pelo ZIKV BR. Associado a isso, verificamos a manutenção da concentração espermática. Porém, houve redução na mobilidade dos espermatozoides, indicando que a infecção pelo ZIKV pode modular concomitantemente a abundância de PGK2 e a mobilidade dos espermatozoides.

Nós também avaliamos os níveis de expressão dos transportadores de glicose 2 e 3 (GLUT 2 e GLUT 3) e Hexoquinase I. Confirmamos que nos animais imunocompetentes a infecção por ZIKV não modula a expressão dos translocadores GLUT, mesmo apresentando o aumento da abundância de glicose, mas regula negativamente a expressão de Hexoquinase I. Hexoquinase, é encontrada em diferentes isoformas HK1, HK2, HK3 e HK4 sendo a isoforma HK1 a mais distribuída no organismo, ela se associa a mitocôndria por meio do seu domínio de ligação a porina no segmento N terminal (SUN et al., 2008; WILSON, 2003). A hexoquinase 1 apresenta um transcrito variante de células espermogênicas denominado HK1S, que possui

uma substituição desse sítio de ligação a porina por um domínio exclusivo de células germinativas gerado por splicing (ANDREONI; RUZZO; MAGNANI, 2000). Já a HK1S é encontrada em células da espermatogênese do período pós-meiose (NAKAMURA et al., 2008). Nos nossos achados, identificamos que a infecção pelo ZIKV promove redução da abundância de HK1, justamente a hexoquinase mais expressa em células da espermatogênese. A redução da abundância de PGK2 após a infecção pelo ZIKV, indica que a infecção pode modular proteínas da via glicolítica. Esse fenômeno pode ser o principal para o impacto na motilidade dos espermatozoides.

Tomados em conjunto, esses dados dão suporte à nossa hipótese de que um dos mecanismos de persistência viral no testículo possa estar associado à modulação da via glicolítica. Também especulamos que o mecanismo que possa estar envolvido nesse processo no testículo seja similar ao que ocorre na infecção de células C6/36. O mecanismo consiste na infecção por ZIKV induzir o aumento de glicose para gerar aumento de intermediários do ciclo das pentoses, fazendo com que o aumento de ribose-5-fosfato seja utilizado para a replicação viral (THAKER et al., 2019).

Sugerimos que esse acúmulo de glicose no testículo possa estar relacionado a uma modulação intracelular das proteínas do metabolismo da glicose, fazendo com que a célula possa regular outras fontes intracelulares de produção de energia como a via das pentoses. Verificamos ainda que metabólitos como (2E)-4-Hydroperoxy-2-nonenal e ácido 9-Oxononanoico apresentaram maior abundância em testículo de animais infectados por ZIKV. Sendo um indicativo de que as células podem estar optando por beta-oxidação dos ácidos graxos para a demanda de energia já que a alteração na homeostase lipídica da célula hospedeira é uma estratégia de criar um ambiente próprio para a replicação viral (CHUKKAPALLI; HEATON; RANDALL, 2012; QUEIROZ et al., 2019). Porém precisamos investigar mais profundamente se o ZIKV modula direta ou indiretamente a glicólise.

A infecção pelo ZIKV PO promove efeitos diretos na fertilidade masculina (BAUD et al., 2017; DE LA VEGA et al., 2019; STASSEN et al., 2018). Contudo, ainda não está claro se a modulação da glicólise afeta diretamente a fertilidade. Portanto, estudos longitudinais, que monitoram a infecção por ZIKV na contagem de sêmen e espermatozoides, precisam ser realizados para suportar à ideia de que a modulação da via glicolítica pelo ZIKV possa estar gerando consequências na infertilidade masculina.

Verificamos ainda que em outros modelos animais a expressão de PGK1 e PGK2 continuam apresentando uma modulação negativa em testículos de animais infectados por ZIKV. Porém, em animais imunocomprometidos, verificamos que a expressão de GLUT 2 está

aumentada enquanto que a expressão de GLUT 3 é reduzida. Rasschaert e colaboradores mostraram que em células beta pancreáticas infectadas há acúmulo de RNA viral de cadeia dupla que junto com IFN- γ resulta em disfunção celular, levando a um aumento da expressão de GLUT2 (RASSCHAERT et al., 2003). No nosso modelo de animais imunocomprometidos, uma provável hipótese de aumento na expressão de GLUT2 em animais infectados seria que a ausência IFN- γ e a infecção por ZIKV poderiam em conjuntos, estar então favorecendo o aumento da expressão de GLUT2. Porém nos modelos imunocompetentes verificamos que a expressão de GLUT 2 é aumentada e GLUT3 é diminuída significativamente. Shakeel e colaboradores demonstraram que em modelo de criptorquidia, que mudanças degenerativas em espermatogônias são causadas pelo aumento significativo de transportador GLUT2 e diminuição de 85% de transportador GLUT3 (FAROOQUI et al., 1997). As alterações no transportador GLUT3 podem ser danosas no testículo, pois esses já foram descritos como sendo os principais transportadores GLUT nesse órgão (HAHN et al., 2017). Além disso alguns resultados sugerem que os transportadores GLUT3 são significativamente presentes no testículo (HAHN et al., 2017). Assim, modulações na abundância dessa proteína podem promover efeitos importantes na homeostase testicular.

Alguns trabalhos mostraram o material genético viral no testículo após um longo período da infecção, sugerindo que as células testiculares, incluindo CGs, têm um papel em potencial para o suporte e propagação do ZIKV (CLANCY et al., 2019; NICASTRI et al., 2016; ROBINSON et al., 2018; STASSEN et al., 2018). No nosso modelo vimos que após 183 dias de infecção pelo ZIKV o testículo de animais apresenta tamanho e dimensões reduzidas quando comparada a infecção de 14 dias indicando que os efeitos da infecção podem estar modulando e permanecendo nesse órgão imunoprivilegiado por um longo período. De forma diferencial aos dados obtidos com 14 dias de infecção as proteínas do metabolismo energético encontram-se negativamente moduladas após esse longo período de infecção, como Hexoquinase I e GLUT2.

De modo geral, alguns prévios estudos sobre a infecção pelo ZIKV em camundongos tratados com anticorpo monoclonal anti-Ifnar1 demonstraram comprometimento na fertilidade masculina, acompanhados de atrofia testicular, níveis mais baixos de testosterona sérica e oligospermia (GOVERO et al., 2016; URAKI et al., 2017). Aqui, verificamos que animais que apresentaram alto comprometimento em tamanho e dimensões testiculares, também apresentaram altos níveis de albumina sérica. De forma interessante, importante ressaltar que a albumina sérica é a principal carreadora de testosterona no plasma (CHRISTENSEN et al., 1985). Em ratos com torsões testiculares foi visto uma alta quantidade de albumina, corroborando nossos achados (ZHENG et al., 2011). Sendo uma possível hipótese para ambos

trabalhos a exudação por aumento de permeabilidade vascular. Porém, precisamos investigar essa hipótese e também a correlação hormonal com a infecção pelo ZIKV.

Estudos em camundongos mostram uma diminuição do número de espermatozoides, um aumento na fragmentação e uma diminuição na motilidade e na motilidade progressiva de espermatozoides, durante e após 21 dias da infecção por ZIKV (GRIFFIN et al., 2017). Em humanos não verificamos diferenças significativas desses parâmetros. Porém, identificamos que o paciente que apresentou maiores alterações espermáticas também apresentou um perfil proteômico diferencial de todos os outros pacientes, mesmo sendo um paciente sem comorbidades e sem doenças prévias. Além disso, o perfil proteômico do sêmen de pacientes que foram infectados por ZIKV também apresenta alteração quando comparados ao controle negativo para ZIKV.

Portanto, o presente trabalho apresentou novos indícios de como a infertilidade masculina pode estar sendo causada pelo ZIKV e pode estar relacionada com moléculas da via glicolítica. Além disso, nosso trabalho apresentou dados de base para estudos futuros acerca do potencial terapêutico da modulação de proteínas do metabolismo energético pela infecção pelo ZIKV e a infertilidade masculina.

7. Conclusões

Tomados todos os resultados do presente trabalho em conjunto, concluímos que:

- Animais infectados com a cepa ZIKV BR apresentam maior viremia do que animais infectados pela cepa ZIKV PO
- A cepa ZIKV BR, e não a ZIKV PO, apresenta maior tropismo pelo testículo e capacidade de permanência em testículo de animais imunocompetentes.
- Mutações em resíduos específicos podem estar sendo o principal fator para que a cepa ZIKV BR tenha maiores vantagens na infecção do que a cepa ZIKV PO, como o resíduo 122 da proteína NS1, mas estudos adicionais são necessários para se verificar isso.
- ZIKV induz mudança no perfil metabólico do testículo.
- A infecção pela cepa ZIKV BR modula a abundância de PGK2 e outras proteínas da via glicolítica, porém não há impacto significativo na concentração de ATP.
- ZIKV é capaz de modular o metabolismo da glicose, gerando acúmulo de glicose nos testículos de animais infectados, além de modular algumas proteínas da via glicolítica. Este pode ser um mecanismo de persistência viral, impactando na mobilidade e função espermática.
- Sêmen de homens previamente infectados com ZIKV, mesmo que a longo prazo, apresentam modificação do perfil proteômico quando comparado ao sêmen dos homens controle, alterando a expressão de moléculas tais como methyltransferase-like protein, mucin-5AC, myeloblastin, mucin-6, cytochrome b5, Glutathione S-transferase 4.

8. Referências

- AGUMADU, V. C.; RAMPHUL, K. Zika Virus: A Review of Literature. **Cureus**, v. 9, n. 12, p. 1–5, 2018.
- AHLERS, L. R. H.; GOODMAN, A. G. The Immune Responses of the Animal Hosts of West Nile Virus : A Comparison of Insects , Birds , and Mammals. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1–9, 2018.
- ALAYLI, F.; SCHOLLE, F. Dengue virus NS1 enhances viral replication and pro-inflammatory cytokine production in human dendritic cells. **Virology**, v. 496, p. 227–236, 2016.
- ALIOTA, M. T. et al. Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–11, 2016.
- ALLONSO, D. et al. Dengue Virus NS1 Protein Modulates Cellular Energy Metabolism by Increasing Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. **Journal of Virology**, v. 89, n. 23, p. 11871–11883, 2015.
- ALMEIDA, N. et al. Zika Virus Vaccines : Challenges and Perspectives. **Vaccines**, v. 6, n. 62, p. 1–13, 2018.
- ALVES, M. G. et al. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 5, p. 777–793, 2013.
- AMARAL, A. et al. Human Sperm Tail Proteome Suggests New Endogenous Metabolic Pathways. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 2, p. 330–342, 2013.
- ANDREONI, F.; RUZZO, A.; MAGNANI, M. Structure of the 5' region of the human hexokinase type I (HKI) gene and identification of an additional testis-specific HKI mRNA. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1493, n. 1–2, p. 19–26, 2000.
- ARAUJO, A. Q. C.; SILVA, M. T. T.; ARAUJO, A. P. Q. C. Zika virus-associated neurological disorders : a review. **Brain a Journal of Neurology**, v. 139, p. 2122–2130, 2018.
- ATKINSON, B. et al. Detection of Zika Virus in Semen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 160107, 2016.

- AVELINO-SILVA, V. I. et al. Potential effect of Zika virus infection on human male fertility? **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v. 60:e64, p. 2–5, 2018.
- AVIRUTNAN, P. et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 4, p. 793–806, 2010.
- AYRES, C. F. J. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **The Lancet**, v. 16, p. 278–279, 2016.
- BAJPAI, M.; GUPTA, G.; SETTY, B. S. Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. **European Journal of Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 322–327, 1998.
- BAKER, S. J.; REDDY, E. P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. **Oncogene**, v. 17, n. 25, p. 3261–3270, 1998.
- BAUD, D. et al. Zika virus: A new threat to human reproduction. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, p. 1–13, 2017.
- BECKHAM, J. D. et al. Arbovirus Infections. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2017.
- BEYS-DA-SILVA, W. O. et al. Zika Virus Infection of Human Mesenchymal Stem Cells Promotes Differential Expression of Proteins Linked to Several Neurological Diseases. 2018.
- BIENIEK, J.; DRABOVICH, A.; LO, K. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, p. 426, 2016.
- BOER, P. H. et al. The testis-specific phosphoglycerate kinase gene pgk-2 is a recruited retroposon. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 9, p. 3107–3112, 1987.
- BONALDO, M. C. et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1–17, 2016.
- BOUSSOUAR, F.; BENAHMED, M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 7, p. 345–350, 2004.
- BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 21, n. 97, p. 77–89, 1968.
- BRASIL, P. et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization,

Epidemiological and Virological Aspects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–13, 2016.

BRAUCHI, S. et al. Kinetics, molecular basis, and differentiation of l-lactate transport in spermatogenic cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 3, p. 523–534, 2004.

BUCCI, D. et al. Gluts and mammalian sperm metabolism. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 4, p. 348–355, 2011.

CALVEZ, E. et al. Differential transmission of Asian and African Zika virus lineages by *Aedes aegypti* from New Caledonia. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 2018.

CDC. **Zika virus Transmission Methods**. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/zika/prevention/transmission-methods.html>>. Acesso em: 7 jan. 2019.

CHIDA, J. et al. An efficient extraction method for quantitation of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. **Analytica Chimica Acta**, v. 727, p. 8–12, 2012.

CHIDA, J.; KIDO, H. Extraction and Quantification of Adenosine Triphosphate in Mammalian Tissues and Cells. In: **Bioluminescent Imaging: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. Ripp, Stev ed. 1098p. 21–32.

CHRISTENSEN, A. K. et al. The distribution of serum albumin in the rat testis, studied by electron microscope immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. **Endocrinology**, v. 116, n. 5, p. 1983–1996, 1985.

CHUKKAPALLI, V.; HEATON, N. S.; RANDALL, G. Lipids at the interface of virus-host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 512–518, 2012.

CLANCY, C. S. et al. Zika Virus Associated Pathology and Antigen Presence in the Testicle in the Absence of Sexual Transmission During Subacute to Chronic Infection in a Mouse Model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

D’ORAZIO, T. J.; NIEDERKORN, J. Y. A novel role for TGF- β and IL-10 in the induction of immune privilege. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 5, p. 2089–2098, 1998.

D’ORTENZIO, E.; MATHERON, S.; YAZDANPANA, Y. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **The new England Journal of Medicine**, n. 374, p. 2195–2198, 2016.

- DA SILVA, I. R. F. et al. Neurologic complications associated with the Zika virus in Brazilian adults. **JAMA Neurology**, v. 74, n. 10, p. 1190–1198, 2017.
- DABAJA, M. Z. et al. Metabolic alterations induced by attenuated Zika virus in glioblastoma cells. **Cell and Bioscience**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.
- DANSHINA, P. V et al. Phosphoglycerate Kinase 2 (PGK2) Is Essential for Sperm Function and Male Fertility in Mice. **Biology of Reproduction**, v. 145, p. 136–145, 2010.
- DAS NEVES ALMEIDA, R. et al. Zika Virus Vaccines: Challenges and Perspectives. **Vaccines**, v. 6, p, 1-13, 2018.
- DAVIDSON, A. et al. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City , 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 28, p. 716–717, 2016.
- DE LA VEGA, M. A. et al. Zika-Induced Male Infertility in Mice Is Potentially Reversible and Preventable by Deoxyribonucleic Acid Immunization. **Journal of Infectious Diseases**, v. 219, n. 3, p. 365–374, 2019.
- DE PAULA MARTINS, R. et al. Neopterin preconditioning prevents inflammasome activation in mammalian astrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 115, n. November 2017, p. 371–382, 2018.
- DECKARD, D. T. et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016. **CDC Morbidity and Mortality Weekly Report Male-to-Male**, v. 65, n. 14, p. 372–374, 2016.
- DIAS, T. R. et al. Sperm glucose transport and metabolism in diabetic individuals. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 396, n. 1–2, p. 37–45, 2014.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and Serological Specificity. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE.**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DING, G.-L. et al. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 6, p. 948, 2015.
- DONG, S.; LIANG, Q. Recent Advances in Animal Models of Zika Virus Infection. **Virologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 125–130, 2018.
- DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New**

England Journal of Medicine, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

ESSER-NOBIS, K. et al. Comparative analysis of African and Asian lineage-derived Zika Virus strains reveals differences in activation of and sensitivity to antiviral innate immunity.

Journal of Virology, v. 93, n. 13, p. 1–18, 2019.

ESWAR, N. et al. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. In: **Curr Protoc Bioinformatics**. p. 47.

FAROOQUI, S. M. et al. Degenerative changes in spermatogonia are associated with loss of glucose transporter (Glut 3) in abdominal testis of surgically induced unilateral cryptorchidism in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 236, n. 2, p. 407–412, 1997.

FERRARIS, P.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Zika virus infection: an update. **Microbes and Infection**, n. 1–8, 2019.

FIJAK, M.; BHUSHAN, S.; MEINHARDT, A. Immunoprivileged Sites: The Testis. In: **Suppression and Regulation of Immune Responses: Methods and Protocols . Humana Press, New York.** v. 677p. 459–470.

FISHER, N. T.; GINSBERG, S. H. Accumulation of Organic Acids by HeLa Cells Infected with Type 4 Adenovirus. **Proc Soc Exp Biol Med**, p. 95:47–57, 1957.

FONTAINE, K. A. et al. Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. **Journal of Virology**, v. 89, n. 4, p. 2358–2366, 2015.

FORD, W. C. L. Glycolysis and sperm motility: Does a spoonful of sugar help the flagellum go round? **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p. 269–274, 2006.

FOY, B. D. et al. Probable Non – Vector-borne Transmission of Zika Virus , Colorado , USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 1–7, 2011.

GALARDO, M. N. et al. Adenosine regulates Sertoli cell function by activating AMPK. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 330, n. 1–2, p. 49–58, 2010.

GAN, R. Regulation and Functions of Interleukin-6 in the Mammalian Testis. **International Journal of Modern Biology and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 81–90, 2014.

GARCIA, E. et al. Zika virus infection: global update on epidemiology and potentially associated clinical manifestations. **Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section**

d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations, v. 91, n. 7, p. 73–81, 2016.

GILBERT-JARAMILLO, J. et al. The potential contribution of impaired brain glucose metabolism to congenital Zika syndrome. **Journal of Anatomy**, p. 1–13, 2019.

GITLITS, V. M. et al. The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. **European Journal of Cell Biology**, v. 79, n. 2, p. 104–111, 2000.

GORMAN, M. J. et al. An immunocompetent mouse model of Zika virus infection. **Cell Host and Microbe**, v. 23, n. 5, p. 672–685, 2019.

GOVERO, J. et al. Zika virus infection damages the testes in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 438–442, 2016.

GRANT, A. et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 6, p. 882–890, 2016.

GRIFFIN, B. D. et al. DNA vaccination protects mice against Zika virus-induced damage to the testes. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–8, 2017.

GUEDES, D. R. D. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerg Microbes Infect**, p. 1–11, 2017.

HADDOW, A. D. et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains : Geographic Expansion of the Asian Lineage. v. 6, n. 2, 2012.

HAHN, K. R. et al. Immunohistochemical localization of glucose transporter 1 and 3 in the scrotal and abdominal testes of a dog. **Laboratory Animal Research**, v. 33, n. 2, p. 114, 2017.

HASAN, S. S. et al. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses S. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 25, p. 13–20, 2018.

HERRERA, K. et al. Vertical transmission of Zika virus (ZIKV) in early pregnancy: two cases, two different courses. **Case Reports in Perinatal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 131–133, 2016.

HERY, L. et al. Transmission potential of African, Asian and American Zika virus strains by *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* from Guadeloupe (French West Indies). **Emerging**

Microbes and Infections, v. 8, n. 1, p. 699–706, 2019.

HEUKELBACH, J. et al. Outbreak Zika virus outbreak in Brazil. **The Journal of Infection in developing Countries**, v. 10(2), p. 116–120, 2016.

HILGENFELD, R. Zika virus NS1, a pathogenicity factor with many faces. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 24, p. 2631–2633, 2016.

HILGENFELD, R.; VASUDEVAN, S. G. Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies. In: **Adiktologie**. v. 13p. 82.

HILLS, S. L. et al. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission — Continental United States, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 8, p. 215–216, 2016.

HU, T. et al. The Asian Lineage of Zika Virus: Transmission and Evolution in Asia and the Americas. **Virologica Sinica**, v. 34, n. 1, p. 1–8, 2019.

HUITS, R. et al. Zika virus in semen : a prospective cohort study of symptomatic travellers returning to Belgium. **Bull World Health Organ**, v. 95, p. 802–809, 2017.

HUITS, R. M. et al. Kinetics of Zika virus persistence in semen. **Bulletin of the World Health Organization**, 2016.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics** 14:33-38, v. 14, p. 33–38, 1996.

HUSSAIN, A. et al. A Comprehensive Review of the Manifestations and Pathogenesis of Zika Virus in Neonates and Adults. **Cureus**, v. 10, n. 9, 2018.

HYDROXYLASE, C.; EXPRESSION, P.; BUCHANAN, D. Interleukin-1 Inhibits Leydig Cell Steroidogenesis Primarily by Decreasing 17 alpha-hydroxylase/C17-20 Lyase Cytochrome P450 Expression*. v. 131, n. 5, 1992.

INHORN, M. C.; PATRIZIO, P. Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 4, p. 411–426, 2014.

JIMENEZ CORONA, M. E. et al. Clinical and Epidemiological Characterization of Laboratory-Confirmed Autochthonous Cases of Zika Virus Disease in Mexico. **PLoS Currents**, n. May 2015, p. 1–15, 2016.

JODAR, M.; SOLER-VENTURA, A.; OLIVA, R. Semen proteomics and male infertility. **Journal of Proteomics**, v. 162, p. 125–134, 2017.

JOGUET, G. et al. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids : a prospective observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1200–1208, 2017.

KEVIN RANGE, AND D. M. Y. A. M. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends Immunol**, v. 31, p. 220-227, 2010.

KOKK, K. et al. Immunohistochemical detection of glucose transporters class I subfamily in the mouse, rat and human testis. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 40, n. 2, p. 156–160, 2004.

KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, v. 533, n. 7603, p. 425–428, 2016.

KOVAC, J. R.; PASTUSZAK, A. W.; J., L. D. The use of genomics, proteomics and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertil. Steril.**, v. 99, n. 4, p. 998–1007, 2013.

KRAMER, J. M.; ERICKSON, R. P. Developmental Program of PGK-1 and PGK-2 Isozymes Spermatogenic Cells of the Mouse : Specific Activities and Rates of Synthesis. **Developmental biology**, v. 87, p. 37–45, 1981.

KRAUSZ, C.; ESCAMILLA, A. R.; CHIANESE, C. Genetics of male infertility: From research to clinic. **Reproduction**, v. 150, n. 5, p. R159–R174, 2015.

KUMAR, A. et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. **EMBO reports**, v. 17, n. 12, p. 1766–1775, 2016.

KUMAR, A. et al. Human sertoli cells support high levels of zika virus replication and persistence. **Scientific Reports**, v. 8, n. 5477, p. 1–11, 2018.

KYUNG, M. C. et al. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 50, p. 19111–19116, 2006.

LAMB, L. E. et al. Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitos

- by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic , Yap State , Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.
- LANDINI, M. P. Early enhanced glucose uptake in human cytomegalovirus-infected cells. **Journal of General Virology**, v. 65, n. 7, p. 1229–1232, 1984.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.
- LEE, C. Y.; NG, L. F. P. Zika virus : from an obscurity to a priority. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 11–12, p. 635–645, 2018.
- LIN, S. C. et al. Phloretin inhibits Zika virus infection by interfering with cellular glucose utilisation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, n. 1, p. 80–84, 2019.
- LIN, T. et al. Interleukin-1 inhibits cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 expression in primary cultures of leydig cells. **Endocrinology**, v. 129, n. 3, p. 1305–1311, 1991.
- LIU, X. et al. Characteristics of testis-specific phosphoglycerate kinase 2 and its association with human sperm quality. **Human Reproduction**, v. 31, n. 2, p. 273–279, 2016.
- LIU, X. et al. Aberrant expression of sperm-specific glycolytic enzymes are associated with poor sperm quality. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 4, p. 2471–2478, 2019.
- LOVELAND, K. L. et al. Cytokines in male fertility and reproductive pathologies: Immunoregulation and beyond. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. NOV, p. 1–16, 2017.
- LYSIAK, J. J. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 1–10, 2004.
- MA, H. et al. Testing blood glucose may be useful in the management of dengue. **Mymensingh Med J.**, v. 19(3):382-, 2010.
- MA, W. et al. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1511- 1518.e10, 2016.

- MANSUY, J. M. et al. Zika virus: High infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 405, 2016.
- MARTIN-BLONDEL, G. Zika virus in semen and spermatozoa. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 10, p. 1106–1107, 2016.
- MATHERON, S. et al. Long-Lasting Persistence of Zika Virus in Semen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 9, p. 1264, 2016.
- MATUSALI, G. et al. Zika virus infects human testicular tissue and germ cells Find the latest version : Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 10, p. 4697–4710, 2018.
- MCCARREY, J. R. et al. Differential Transcription of P_{gk} Genes during Spermatogenesis in the Mouse. **Developmental biology**, v. 168, p. 160–168, 1992.
- MCDONALD, E. M. et al. Infection of epididymal epithelial cells and leukocytes drives seminal shedding of Zika virus in a mouse model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1–22, 2018.
- MELO, C. F. O. R. et al. Serum metabolic alterations upon ZIKA infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–10, 2017.
- MELRON, D. W. HPRT gene organization and expression. In: **Oxford Surveys on Eukaryotic Genes. Oxford University Press, Vol 4.** p. 34–76.
- MORI, C. et al. Unique Hexokinase Messenger Ribonucleic Acids Lacking the Porin-Binding Domain are Developmentally Expressed in Mouse Spermatogenic Cells1. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 2, p. 191–203, 2005.
- MORI, N. et al. The nucleotide sequence of a cDNA clone containing the entire coding region for mouse X-chromosome-linked phosphoglycerate kinase. **Gene**, v. 45, p. 275–280, 1986.
- MORRISON, T. E.; DIAMOND, M. S. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. v. 91, n. 8, p. 1–15, 2017.
- MUÑOZ, L. S. et al. Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, p. 897–905, 2017.
- MUSSO, D. et al. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.

- MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 12, p. 1001.e1-1001.e3, 2017.
- MUTEBI, J. et al. Infectivity for Bolivian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1657–1660, 2004.
- NAKAMURA, N. et al. Spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase is the predominant hexokinase in sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 4, p. 632–640, 2008.
- NAKAMURA, N. et al. Disruption of a Spermatogenic Cell-Specific Mouse Enolase 4 (Eno4) Gene Causes Sperm Structural Defects and Male Infertility1. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 4, p. 1–12, 2013.
- NGUYEN, T. M. D. Impact of 5'-amp-activated Protein Kinase on Male Gonad and Spermatozoa Functions. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, n. March, p. 1–9, 2017.
- NICASTRI, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 32, p. 30314., ago. 2016.
- NM_007393.3, N. R. S. *Mus musculus* actin, beta (Actb), mRNA. **Gene Bank**, [s.d.].
- NM_178689.4, N. R. S. **Mus musculus enolase 4 (Eno4), mRNA**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_178689.4>.
- OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report , French Polynesia , December 2013. **Euro Surveillance**, v. 1, n. December 2013, p. 7–9, 2014.
- OLIVEIRA, P. F. et al. The Warburg Effect Revisited—Lesson from the Sertoli Cell. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, n. 1, p. 126–151, 2015.
- OZKURT, Z.; TANRIVERDI, E. C. Global Alert : Zika Virus-an Emerging Arbovirus. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 49, p. 142–147, 2017.
- OZTURK, H. et al. Interleukin 10 reduces testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. **Urology**, v. 83, n. 2, p. 508.e1-508.e6, 2014.
- PACE, J. L. et al. Expression of Tumor Necrosis Factor- α in Mouse Spermatogenic Cells*. v.

133, n. 1, 1993.

PARKA, H.-J. et al. Species-specific expression of phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) in the developing porcine testis. **Science Directs Theriogenology**, v. 110, p. 158–167, 2018.

PETRIDOU, C. et al. Prolonged Zika virus RNA detection in semen of immunosuppressed patient. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 8, p. 1598–1600, 2019.

PHUMEE, A. et al. Vertical transmission of Zika virus in *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

QUEIROZ, A. et al. Lipidomic Analysis Reveals Serum Alteration of Plasmalogens in Patients Infected With ZIKA Virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–10, 2019.

RASSCHAERT, J. et al. Global profiling of double stranded RNA- and IFN- γ -induced genes in rat pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 46, n. 12, p. 1641–1657, 2003.

RATO, L. et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**, v. 9, n. 6, p. 330–338, 2012.

RIERA, M. F. et al. Molecular mechanisms involved in Sertoli cell adaptation to glucose deprivation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 4, p. E907–E914, 2009.

RNA, Z. et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **The new england journal of medicine**, p. 1–3, 2016.

ROBINSON, C. L. et al. Male germ cells support long-term propagation of Zika virus. **Nature Communications**, p. 1–11, 2018.

ROTHAN, H. A. et al. Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells. v. 2018, 2018.

ROUNDY, C. M. et al. Lack of evidence for Zika virus transmission by *Culex* mosquitoes. **Nature Publishing Group**, n. September, p. 3–4, 2017.

RUDOLPH, K. E. et al. Incubation periods of mosquito-borne viral infections: a systematic review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 882–891, 2014.

SHAO, Q. et al. The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and dengue virus. **Development**, v. 144, n. 22, p. 4114–4124, 2017.

SHEHU, N. Y. et al. Pathogenesis, Diagnostic Challenges and Treatment of Zika Virus Disease in Resource-limited Settings. **Nigerian Postgraduate Medical Journal** |, n. January, p. 19–26, 2018.

SHENG, Z.-Y. et al. Sertoli Cells Are Susceptible to ZIKV Infection in Mouse Testis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 272, 2017.

SHERIDAN, M. A. et al. African and Asian strains of Zika virus differ in their ability to infect and lyse primitive human placental trophoblast. **PLoS ONE**, p. 1–18, 2018.

SHIMOZU, Y. et al. 4-Hydroperoxy-2-nonenal is not just an intermediate but a reactive molecule that covalently modifies proteins to generate unique intramolecular oxidation products. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 33, p. 29313–29324, 2011.

SHRIVASTAVA, S. et al. Whole genome sequencing , variant analysis , phylogenetics , and deep sequencing of Zika virus strains. **Scientific Reports**, v. 8:15843, n. October, p. 1–11, 2018.

SIEMANN, D. N. et al. Zika Virus Infects Human Sertoli Cells and Modulates the Integrity of the In Vitro Blood-Testis Barrier Model. **Journal of Virology**, v. 91, n. 22, 2017.

SILVA, E. M. et al. Dengue virus nonstructural 3 protein interacts directly with human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and reduces its glycolytic activity. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2019.

SIMONIN, Y. et al. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005821, 2017.

SINGER-SAM, J. et al. Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase, and Zfy gene transcripts during mouse spermatogenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 5, p. 1255–1259, 1990.

SLAVOV, S. N. et al. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, p. 1–11, 2016.

SONG, H. et al. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 23, n. 5, p. 456–458, 2016.

STASSEN, L. et al. Zika Virus in the Male Reproductive Tract. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 198, 2018.

- STRANGE, D. P. et al. Immunoprofiles of human Sertoli cells infected with Zika virus reveals unique insights into host-pathogen crosstalk. **Scientific Reports**, n. May, p. 1–15, 2018.
- STRANGE, D. P. et al. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. **mBio**, v. 10, n. 4, p. 1–16, jul. 2019.
- SUN, L. et al. Glucose Phosphorylation and Mitochondrial Binding Are Required for the Protective Effects of Hexokinases I and II. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 3, p. 1007–1017, 2008.
- SUN, S. et al. Phosphoglycerate kinase-1 is a predictor of poor survival and a novel prognostic biomarker of chemoresistance to paclitaxel treatment in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 8, p. 1332–1339, 2015.
- SUWANMANEE, S.; LUPLERTLOP, N. Dengue and Zika viruses : lessons learned from the similarities between these Aedes mosquito-vectored arboviruses. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 81–89, 2017.
- TANG, W. W. et al. A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication. **CellReports**, v. 17, n. 12, p. 3091–3098, 2016.
- THAI, M. et al. MYC-induced reprogramming of glutamine catabolism supports optimal virus replication. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–9, 2015.
- THAKER, S. K. et al. Differential Metabolic Reprogramming by Zika Virus Promotes Cell Death in Human versus Mosquito Cells. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 5, p. 1206- 1216.e4, 2019.
- THAKER, S. K.; CH'NG, J.; CHRISTOFK, H. R. Viral hijacking of cellular metabolism. **BMC biology**, v. 17, n. 1, p. 59, 2019.
- TIWARI, S. K. et al. Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection. **Emerging microbes & infections**, v. 6, n. 4, p. e24-10, 2017.
- TOWERS, S. et al. Estimate of the reproduction number of the 2015 Zika virus outbreak in Barranquilla, Colombia, and estimation of the relative role of sexual transmission. **Epidemics**, v. 17, p. 50–55, 2016.
- TSETSARKIN, K. A. et al. Routes of Zika virus dissemination in the testis and epididymis of

- immunodeficient mice. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.
- UCHIDA, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 4, p. 318–343, 2003.
- URAKI, R. et al. Zika virus causes testicular atrophy. **Science Advances**, v. 3, n. e1602899, p. 1–6, 2017.
- VASTAG, L. et al. Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, 2011.
- VIAL, T. et al. Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–16, 2018.
- VIELLE, N. J. et al. Silent infection of human dendritic cells by African and Asian strains of Zika virus. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- VOROU, R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: What we know and what we should investigate urgently. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, p. 85–90, 2016.
- WARREN DW, PASUPULETI V, LU Y, PLATLER BW, H. R. Tumor necrosis factor and interleukin-1 stimulate testosterone secretion in adult male rat Leydig cells in vitro. **Journal of Andrology**, v. Jul-Aug;11, 1990.
- WEITZEL, T.; CORTES, C. P. Images in clinical tropical medicine Zika Virus infection presenting with postauricular lymphadenopathy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, p. 255–256, 2016.
- WEN, Z.; SONG, H.; MING, G. L. How does Zika virus cause microcephaly? **Genes and Development**, v. 31, n. 9, p. 849–861, 2017.
- WILLIAMS, A C.; FORD, W. C. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. **Journal of andrology**, v. 22, n. 4, p. 680–695, 2001.
- WILSON, J. E. Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, subcellular localization and metabolic function. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 12, p. 2049–2057, 2003.
- WINKLER, C. W. et al. Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. **The Journal of Immunology**, v. 198, p. 3526–3535, 2017.

WIRLEITNER, B. et al. Neopterin in HIV-1 infection. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 2, p. 183–194, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention of potential sexual transmission of Zika virus. **Interim guidance update**, v. 21, n. June, p. 1–2, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction**. Cambridge: Cambridge University Press. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. **Fifth meeting of the Emergency Committee under the International Health Regulations (2005) regarding microcephaly, other neurological disorders and Zika virus**.

XU, X. et al. Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS 1 structure . **The EMBO Journal**, v. 35, n. 20, p. 2170–2178, 2016.

YOUNG, J. C.; WAKITANI, S.; LOVELAND, K. L. TGF- β Superfamily Signaling in Testis Formation and Early Male Germline Development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 45, p. 94–103, 2015.

YU, Y.; MAGUIRE, T. G.; ALWINE, J. C. Human Cytomegalovirus Activates Glucose Transporter 4 Expression To Increase Glucose Uptake during Infection. **Journal of Virology**, v. 85, n. 4, p. 1573–1580, 2011.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZHANG, Y. et al. Evaluation of zika virus-specific t-cell responses in immunoprivileged organs of infected ifnar1^{-/-} mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 140, p. 1–10, 2018.

ZHENG, N. et al. Rat serum albumin is not equal to human serum albumin. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 8, p. e81, 2011.

ZHENG, P. et al. In vitro differentiation of sperm from male germline stem cell. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 2964–2969, 2015.

9. Produções Acadêmicas Relacionadas com o tema da tese de doutorado



Review

The Cellular Impact of the ZIKA Virus on Male Reproductive Tract Immunology and Physiology

Raquel das Neves Almeida ¹, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo ¹, Igor de Oliveira Santos ¹, Rafael Corrêa ¹, Gary P. Kobinger ^{2,3} and Kelly Grace Magalhaes ^{1,*}

¹ Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, 70910-900 Brasilia, Distrito Federal, Brazil; raquel.unb.bio@gmail.com (R.d.N.A.); heloisa.antoniella@gmail.com (H.A.B.-d.-M.); igorosantosbio@gmail.com (I.d.O.S.); rafaelcorrea31@gmail.com (R.C.)

² Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Université Laval, Quebec City, QC G1V 4G2, Canada; Gary.Kobinger@crchudequebec.ulaval.ca

³ Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec-Université Laval, Quebec City, QC G1V 4G2, Canada

* Correspondence: kellymagalhaes@unb.br; Tel.: +55-61-3107-3099-3103

Received: 11 March 2020; Accepted: 15 April 2020; Published: 18 April 2020



Abstract: Zika virus (ZIKV) has been reported by several groups as an important virus causing pathological damage in the male reproductive tract. ZIKV can infect and persist in testicular somatic and germ cells, as well as spermatozoa, leading to cell death and testicular atrophy. ZIKV has also been detected in semen samples from ZIKV-infected patients. This has huge implications for human reproduction. Global scientific efforts are being applied to understand the mechanisms related to arboviruses persistency, pathogenesis, and host cellular response to suggest a potential target to develop robust antiviral therapeutics and vaccines. Here, we discuss the cellular modulation of the immunologic and physiologic properties of the male reproductive tract environment caused by arboviruses infection, focusing on ZIKV. We also present an overview of the current vaccine effects and therapeutic targets against ZIKV infection that may impact the testis and male fertility.

Keywords: Sertoli cells; Leydig cells; ZIKA virus; arboviruses; infertility




1. Introduction

The testis is a reproductive gland that is part of the internal structures of the male reproductive tract (MRT) and is involved in spermatogenesis and steroidogenesis. Each testis is composed of a tangle of tubes, the seminiferous ducts. These ducts are formed by Sertoli cells (SCs) and the germinal epithelium, which is responsible for ensuring protection and nutrition to accurate spermatogenesis. Leydig cells (LCs) are found in the testis interstitium, adjacent to the seminiferous tubules. LCs promote steroidogenesis through the secretion of male sex hormones, especially testosterone, responsible for the development of male genital organs and secondary sexual characters [1,2].

The testis is considered an immune-privileged organ [3]. This is essential to ensure the immunogenic germ cell protection against immune system activation during spermatogenesis. This is mainly provided by the combination of a local immunosuppressive environment and systemic immune tolerance [4–6]. It has long been assumed that the blood–testis barrier (BTB) constitutes the main mechanism of the immune-privileged status of the testis [7]. In addition to BTB and anatomical impairment of external cells' and molecules' entrance to testis, SCs also provide anti-inflammatory mediator secretion aiming to maintain the tolerogenic microenvironment [8]. However, many local immune modulators, including macrophages, dendritic cells (DCs), natural killer cells (NKs), mast cells and T-lymphocytes, contribute to the intercommunication among testicular components [9–12].

Review

Zika Virus Vaccines: Challenges and Perspectives

Raquel das Neves Almeida ¹, Trina Racine ^{2,3}, Kelly G. Magalhães ¹ and Gary P. Kobinger ^{2,3,4,5,6,*}

¹ Laboratory of Immunology and Inflammation, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil; raquel.das-neves-almeida.1@ulaval.ca (R.d.N.A.); kellymagalhaes@gmail.com (K.G.M.)

² Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec—Université Laval, Québec, QC G1V 4G2, Canada; trina.racine@crchudequebec.ulaval.ca

³ Department of Medical Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, MB R3E 0J9, Canada

⁴ Department of Immunology, University of Manitoba, Winnipeg, MB R3E 0T5, Canada

⁵ Département de Microbiologie-Infectiologie et D'immunologie, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada

⁶ Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA 19104-4238, USA

* Correspondence: Gary.Kobinger@crchudequebec.ulaval.ca; Tel.: +1-418-525-4444

Received: 20 August 2018; Accepted: 11 September 2018; Published: 13 September 2018



Abstract: Zika virus is an arbovirus that has rapidly spread within the Americas since 2014, presenting a variety of clinical manifestations and neurological complications resulting in congenital malformation, microcephaly, and possibly, in male infertility. These significant clinical manifestations have led investigators to develop several candidate vaccines specific to Zika virus. In this review we describe relevant targets for the development of vaccines specific for Zika virus, the development status of various vaccine candidates and their different platforms, as well as their clinical progression.

Keywords: zika virus; flaviviruses; vaccines; animal models; immunopathology; immune responses; challenge; clinical trials

1. Introduction

Flavivirus is a genus of viruses in the family *Flaviviridae* that includes *Dengue virus* (DENV), *Yellow fever virus* (YFV), *West Nile virus* (WNV), and *Zika virus* (ZIKV), all of which are transmitted by arthropod vectors [1–3]. However, ZIKV presents with additional modes of transmission to that of mosquito bites via vertical, sexual, and transfusion transmissions [4–7].

ZIKV was originally discovered in a sentinel macaque in the Zika forest in Uganda in 1947, while the first reported case of human infection was identified in 1952 [8]. Thereafter, sporadic infections were reported until the Micronesia outbreak of 2007. Symptoms reported as part of this outbreak included rash, conjunctivitis, and arthralgia [9]. Six years later, another outbreak occurred in French Polynesia and the first cases of hospitalization due to Guillain–Barré syndrome (GBS) were reported [10]. From 2015 onward, several cases of ZIKV infection were detected in Brazil, which then spread to other South American countries, leading the World Health Organization (WHO) to declare ZIKV a public health emergency of international concern (PHEIC) on 1 February 2016, a status subsequently lifted on 18 November 2016 [11,12].

The most recent outbreak of ZIKV was associated with congenital malformation and fetal/newborn microcephaly caused by ZIKV infection during pregnancy [13]. Furthermore, additional clinical manifestations were associated with ZIKV infection including neurological disorders and male infertility in animal models [14,15]. Due to the presence of these clinical complications, rapid scientific investigations began with the goal of better understanding viral pathogenesis, host response,

OPEN Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells

Heloísa Antoniella Braz-De-Melo¹, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento¹, Rafael Corrêa¹, Raquel das Neves Almeida¹, Igor de Oliveira Santos¹, Paulo Sousa Prado², Victor Picolo³, Andreza Fabro de Bem³, Nathalia Pizato⁴ & Kelly Grace Magalhães^{1*}

Zika virus (ZIKV) has a strong tropism for the nervous system and has been related to post-infection neurological syndromes. Once neuronal cells are infected, the virus is capable of modulating cell metabolism, leading to neurotoxicity and cellular death. The negative effect of ZIKV in neuron cells has been characterized. However, the description of molecules capable of reversing these cytotoxic effects is still under investigation. In this context, it has been largely demonstrated that docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 polyunsaturated fatty acid, is highly neuroprotective. Here, we hypothesized that DHA's neuroprotective properties could have an influence on ZIKV-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Our data showed that pre-treatment of SH-SY5Y cells with DHA increased the cell viability and proliferation in ZIKV-infected cells. Moreover, DHA triggered an anti-inflammatory response in those infected cells. Besides, DHA was capable of restoring mitochondria function and number in ZIKV-infected SH-SY5Y cells. In addition, cells pre-treated with DHA prior to ZIKV infection presented a lower viral load at different times of infection. Taking together, these results demonstrated that DHA has a potential anti-inflammatory and neuroprotective effect against ZIKV infection in these neuron-like cells and could be a useful tool in the treatment against this virus.

First discovered in Uganda Forest in 1947, Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne Flavivirus, transmitted by mosquitoes from *Aedes* genus, and, as recently discovered, an arbovirus sexually transmitted^{1,2}. ZIKV has been associated with several neuronal alterations and congenital diseases³. Indeed, ZIKV is closely related to neurological disorders and presents a main tropism for nervous system, being isolated from animals born with microcephaly and infected adult mice brain^{4,5}. Neuronal cells, both progenitors or differentiated ones, suffer a loss of homeostasis when infected with ZIKV and present considerable changes in cell metabolism during infection, due to the presence of specific required metabolites for viral replication^{6,7}. ZIKV-induced neuronal alterations can directly impair neuronal homeostasis leading to decreased cellular proliferation and differentiation capacity of those cells, followed by cell death⁷.

It was also reported that negative influence of ZIKV in neuronal cells has a strong relationship with mitochondrial-sequestration of phospho-TBK1, an important factor that once relocated can cause a disruption in mitosis process, creating a critical environment to neuronal survival⁸. In addition, specific ZIKV proteins are capable of inhibiting Akt-mTOR pathway in neuronal stem cells, which plays essential role on neurogenesis process, cell maturation and migration^{9,10}. Such mechanisms act synergistically to induce neuronal apoptotic cell death and loss of massive cell population during brain development and it can be accompanied by activation of inflammatory response^{7,11,12}.

It is known that inflammation is a key process that orchestrates neuronal damage induced by ZIKV infection¹³. It has been reported that ZIKV intensively induces the generation of pro-inflammatory factors in microglia cells, such as IL-6 and MCP-1, when it infects human fetal brain¹⁴. In addition, pro-inflammatory response triggered

¹Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. ²Central Laboratory of Federal District (LACEN), 70830-010, Brasília, Brazil. ³Department of Physiological Sciences, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. ⁴Department of Nutrition, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. *email: kellymagalhaes@unb.br

SHORT COMMUNICATION

Characterization of the Inflammatory Response during the Acute Phase of Zika or Chikungunya Infections in Patients of the Federal District, Brazil

Rafael Corrêa^{1*} | Isabela da Cunha Costa Cardoso^{1*} | Heloísa Antoniella Braz-de-Melo¹
Raquel das Neves Almeida¹ | Igor de Oliveira Santos¹ | Paulo Sousa Prado²
Rafael Freitas de Oliveira França³ | Carlos Bernardo Tauil⁴ | Gary P Kobinger⁵
Hugh J Willison⁶ | Kelly Grace Magalhães^{1*}

¹Laboratory of Immunology and Inflammation - LIM1, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

²Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal - LACEN-DF, Brasília, DF, Brazil

³Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Department of Medical Sciences, University of Brasília, Brazil

⁵Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec - Université Laval, Québec, QC G1V 4G2, Canada

⁶Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, United Kingdom

*Both authors contributed equally

Abstract

Zika and Chikungunya are arthropod-borne viruses transmitted by *Aedes* mosquitoes that circulate in tropical and subtropical areas and have been causing major outbreaks over the last decades. *Zika virus* infection has been associated with mild symptoms as fever and joint pains as well as with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. The clinical symptoms in Chikungunya infection include skin rashes, high fever and intense joint pain that can evolve to a chronic condition. Arboviral infections are often misdiagnosed due to similar clinical manifestations and the lack of virus-specific tests in some areas. The aim of this study was to measure the levels of inflammatory mediators to better characterize the immune response during *Zika virus* (ZIKV) or *Chikungunya virus* (CHIKV) acute infections in patients of the Federal District, Brazil. Cytokine levels from serum samples of acutely ill ZIKV or CHIKV patients were measured by ELISA. CHIKV patients presented a significant increase in IL-1 β , IL-6, IL-17, and TNF- α . IL-10 and TGF- β were elevated in both ZIKV and CHIKV patients. Eicosanoid levels were assessed by EIA and no alteration was observed in the secretion profile of prostaglandins or leukotrienes. Nitric oxide (NO) levels were assessed by the Griess method and increased levels in both ZIKV and CHIKV patients were observed. Our results showed a specific profile of pro- and anti-inflammatory markers induced by acute ZIKV and CHIKV infection in patients of the Federal District, Brazil.

KEYWORDS

Zika virus, *Chikungunya virus*, Inflammation, Eicosanoids, Cytokines, Nitric oxide

Correspondence

Kelly Grace Magalhaes
Department of Cell Biology
Laboratory of Immunology and Inflammation - LIM1
University of Brasília, DF, Brazil
Tel: +55-61-3107-3099/3103
E-mail: kellymagalhaes@unb.br

1 | SHORT COMMUNICATION

Arboviruses (arthropod-borne viruses) are transmitted by mosquitoes and other hematophagous insects and are associated with important emerging tropical diseases that affect millions of people worldwide. Zika and Chikungunya are among the arboviruses of major interest due to the lack of vaccines

and widespread incidence since they are transmitted by *Aedes aegypti* and other *Aedes* species distributed over tropical and subtropical areas, causing an enormous burden for global public health [1].

Zika virus (ZIKV) is a flavivirus that causes symptomatic infections in 20 to 40% of the cases. Clinical manifestations include skin rashes, conjunctivitis, arthritis, myalgia, fever, and headaches. It was first discovered in Uganda in the late

Zika-Induced Male Infertility in Mice Is Potentially Reversible and Preventable by Deoxyribonucleic Acid Immunization

Marc-Antoine de La Vega,^{1,2} Jocelyne Piret,² Bryan D. Griffin,^{3,4} Chantal Rhéaume,² Marie-Christine Venable,² Julie Carboneau,² Christian Couture,^{5,6} Raquel das Neves Almeida,⁷ Roland R. Tremblay,⁸ Kelly G. Magalhães,⁷ Young K. Park,² Christine C. Roberts,² Joel N. Maslow,^{9,10} Niranjan Y. Sardesai,¹¹ J. Joseph Kim,¹¹ Kar Muthumani,¹² David B. Weiner,¹² Gary P. Kobinger,^{1,2,4,13} and Guy Boivin^{1,2}

¹Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Université Laval, Québec, Canada; ²Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec - Université Laval, Canada; ³Special Pathogens Program, National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada, Winnipeg; ⁴Department of Medical Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada; ⁵Département d'Anatomie-Pathologie, Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Canada; ⁶Département de Biologie Moléculaire, Biochimie Médicale et Pathologie, Université Laval, Québec, Canada; ⁷Laboratory of Immunology and Inflammation, University of Brasília, Brazil; ⁸Unité de Recherche en Reproduction, Santé de la Mère et de l'Enfant, Centre de Recherche du CHU de Québec - Université Laval, Canada; ⁹GeneOne Life Science Inc., Seoul, Korea; ¹⁰Department of Medicine, Morristown Medical Center, New Jersey; ¹¹Inovio Pharmaceuticals, Inc., Plymouth Meeting, Pennsylvania; ¹²The Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania; ¹³Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia

Background. Zika virus (ZIKV) infection has been associated with prolonged viral excretion in human semen and causes testicular atrophy and infertility in 10-week-old immunodeficient mice.

Methods. Male IFNAR^{-/-} mice, knockout for type I interferon receptor, were immunized with GLS-5700, a deoxyribonucleic acid-based vaccine, before a subcutaneous ZIKV challenge with 6×10^5 plaque-forming units at 13 weeks of age. On day 28 post-infection, testes and epididymides were collected in some mice for histological and functional analyses, whereas others were mated with naive female wild-type C57BL/6J.

Results. Although all mice challenged with ZIKV developed viremia, most of them were asymptomatic, showed no weight loss, and survived infection. On day 28 postinfection, none of the unvaccinated, infected mice (9 of 9) exhibited abnormal spermatozoa counts or motility. However, 33% (3 of 9) and 36% (4 of 11) of mated males from this group were infertile, from 2 independent studies. Contrarily, males from the noninfected and the vaccinated, infected groups were all fertile. On days 75 and 207 postinfection, partial recovery of fertility was observed in 66% (2 of 3) of the previously infertile males.

Conclusions. This study reports the effects of ZIKV infection on male fertility in a sublethal, immunodeficient mouse model and the efficacy of GLS-5700 vaccination in preventing male infertility.

Keywords. animal model; DNA vaccine; infertility; sublethal; Zika virus.

Zika virus (ZIKV) was first identified in 1947 from a sentinel monkey in Uganda [1]. After an extended epidemiological lull, ZIKV was reported in Pacific Islands and then confirmed to be actively circulating in Brazil in 2015 before spreading throughout the Americas [2]. After the reports of neurological disorders such as Guillain-Barré syndrome and microcephaly that were temporally associated to ZIKV infection [3], the World Health Organization (WHO) stated on February 1, 2016, that the epidemic was a Public Health Emergency of International Concern [4], a status subsequently lifted on November 18, 2016. These events led to a huge research effort being conducted on this

re-emerging pathogen. Although vector-based transmission is predominant, it was rapidly reported that ZIKV transmission in humans could occur via sexual contact and that virus excretion in semen could last for weeks [5–7]. Sexual transmission was reported in male-to-female and male-to-male relationships and also suspected in a female-to-male case [3, 7–16]. These clinical observations were further studied in animal models, and ZIKV-induced histological damage was found in the genital tract of infected mice of both sexes [17–21]. It was also established that exposure of both immunocompetent and immunodeficient mice to ZIKV through the vaginal route led to virus replication in the genital mucosa and to fetal transmission [22]. Further studies in male mice revealed that the genital damage resulting from ZIKV challenge correlated with reduced fertility [23, 24]. Finally, it was shown that vasectomized immunodeficient mice shed reduced amounts of infectious ZIKV in semen [25].

In an effort to reduce ZIKV propagation and associated disease burden, several experimental vaccines have been developed (approximately 40 as of March 2018), with 3 deoxyribonucleic acid (DNA) vaccines, 3 inactivated ZIKV vaccines,

Received 13 April 2018; editorial decision 30 May 2018; accepted 1 June 2018; published online July 24, 2018.

Presented in part: Québec Medical Microbiology and Infectious Disease Annual Meeting, June 2017, Brompton, Québec.

Correspondence: G. Boivin, MD, MSc, FRCPC, Research Center in Infectious Diseases, CHU de Québec-Université Laval, 2705 boulevard Laurier, Room R-709, Québec City, QC, G1V 4G2, Canada (guy.boivin@crchd.uch.quebec.ulaval.ca).

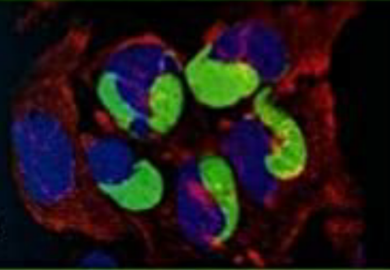
The Journal of Infectious Diseases® 2018;XXX:1–10

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press for the Infectious Disease Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jiy336

Methods in
Molecular Biology 2142


Springer Protocols

Gary Kobinger
Trina Racine *Editors*



Zika Virus

Methods and Protocols

 Humana Press

Inhaltsverzeichnis

Preface...

Table of Contents...

Contributing Authors...

1. Zika Virus: A Brief History and Review of its Pathogenesis Rediscovered
Joel N. Maslow and Christine C. Roberts
2. Zika Virus Isolation, Purification, and Titration
Mariana Baz
3. Evaluating Zika Virus Pathogenesis in Immunocompromised Mice
Bryan D. Griffin, David Safronetz, and Darwyn Kobasa
4. Droplet Digital PCR and Immunohistochemistry Techniques to Detect Zika Virus in the Central Nervous System of Mice
William Enlow, Jocelyne Piret, and Guy Boivin
5. A Plaque Reduction Neutralization Test for the Detection of ZIKV-Specific Antibodies
Kristina Dimitrova, Emelissa J. Mendoza, Nicole Barairo, and Heidi Wood
6. Analysis of Serum Anti-Zika Virus Antibodies by Focus Reduction Neutralization Test
Jessica L. Smith and Alec J. Hirsch
7. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Quantitative Reverse Transcription PCR as a Technique to Analyze Inflammation
Raquel das Neves Almeida, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo, Rafael Corrêa, and Kelly Grace Magalhães
8. Production and Purification of Zika Virus NS1 Glycoprotein in HEK293 Cells
Young Chan Kim, Nallely Garcia-Larragoiti, Cesar Lopez-Camacho, Martha Eva Viveros-Sandoval, and Arturo Reyes-Sandoval
9. Optimization of Small-Scale Production of Zika Virus Envelope Glycoprotein by Transient Expression in HEK293 Cells for ELISA
Young Chan Kim, Maud Dumoux, Raymond J. Owens, and Arturo Reyes-Sandoval
10. Zika Virus Peptide ELISA (ZIKV-NS2B-concat ELISA) for Detection of IgG Antibodies to Zika Virus Infection
Nicholas Mikes, Didiel Thibaut, James Ma, and M. Jay LeDuc

10. Produções Acadêmicas em paralelo ao doutorado



Absence of the Caspases 1/11 Modulates Liver Global Lipid Profile and Gut Microbiota in High-Fat-Diet-Induced Obese Mice

Livia Pimentel de Sant'Ana^{1†}, Dália Juliana S. Ribeiro^{1†}, Aline Maria Araújo Martins², Fábio Neves dos Santos³, Rafael Corrêa⁴, Raquel das Neves Almeida⁴, Marcos Nogueira Eberlin⁴, Corinne F. Maurice⁵ and Kelly Grace Magalhães^{1*†}

¹ Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil, ² CEMIBO—Centro de Metabolómica y Bionálisis, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain, ³ Thomson Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas—UNICAMP, São Paulo, Brazil, ⁴ Department of Chemistry, Mackenzie University, São Paulo, Brazil, ⁵ Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, QC, Canada

OPEN ACCESS

Edited by:
Reinaldo E. Oriá,
Federal University of Goiás, Brazil

Reviewed by:
Zhonghai Yan,
Columbia University, United States
Lucas Francisco Ribeiro Do
Nascimento,
Ministry of Health, Brazil

***Correspondence:**
Kelly Grace Magalhães
kellymagalhães@unb.br

[†] These authors have contributed
equally to this work

ORCID:
Kelly Grace Magalhães
orcid.org/0000-0002-7435-5272

Specialty section:
This article was submitted to
Nutritional Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 26 June 2019
Accepted: 29 November 2019
Published: 09 January 2020

Citation:
Sant'Ana LP, Ribeiro DJS,
Martins AMA, dos Santos FN,
Corrêa R, Almeida RN, Eberlin MN,
Maurice CF and Magalhães KG (2020)
Absence of the Caspases 1/11
Modulates Liver Global Lipid Profile
and Gut Microbiota in
High-Fat-Diet-Induced Obese Mice.
Front. Immunol. 10:2926.
doi: 10.3389/fimmu.2019.02926

Obesity is a chronic disease with rising worldwide prevalence and largely associated with several other comorbidities, such as cancer, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and metabolic syndrome. Hepatic steatosis, a hallmark of NAFLD, is strongly correlated with obesity and has been correlated with changes in the gut microbiota, which can promote its development through the production of short-chain fatty acids (SCFAs) that regulate insulin resistance, bile acid, choline metabolism, and inflammation. Recent studies have suggested a controversial role for the inflammasome/caspase-1 in the development of obesity and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Here, we evaluated the role of inflammasome NLRP3 and caspases 1/11 in the establishment of obesity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice, correlating them with the global lipid profile of the liver and gut microbiota diversity. After feeding wild-type, caspases 1/11, and NLRP3 knockout mice with a standard fat diet (SFD) or a high-fat diet (HFD), we found that the caspases 1/11 knockout mice, but not NLRP3 knockout mice, were more susceptible to HFD-induced obesity, and developed enhanced hepatic steatosis even under SFD conditions. Lipidomics analysis of the liver, assessed by MALDI-MS analysis, revealed that the HFD triggered a significant change in global lipid profile in the liver of WT mice compared to those fed an SFD, and this profile was modified by the lack of caspases 1/11 and NLRP3. The absence of caspases 1/11 was also correlated with an increased presence of triacylglycerol in the liver. Gut microbial diversity analysis, using 16S rRNA gene sequencing, showed that there was also an increase of Proteobacteria and a higher Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the gut of caspases 1/11 knockout mice fed an HFD. Overall, mice without caspases 1/11 harbored gut bacterial phyla involved with weight gain, obesity, and hepatic steatosis. Taken together, our data suggest an important role for caspases 1/11 in the lipid composition of the liver and in the modulation of the gut microbial community composition. Our results further suggest that HFD-induced obesity and the absence of caspases 1/11 may regulate both lipid metabolism and gut microbial diversity, and therefore may be associated with NAFLD and obesity.

Keywords: obesity, gut microbiota, high-fat diet, NAFLD, inflammasome



Lysophosphatidylcholine Induces NLRP3 Inflammasome-Mediated Foam Cell Formation and Pyroptosis in Human Monocytes and Endothelial Cells

Rafael Corrêa¹, Luis Felipe Fonseca Silva¹, Dailia Juliana Silva Ribeiro¹, Raquel das Neves Almeida¹, Igor de Oliveira Santos¹, Luis Henrique Corrêa¹, Livia Pimentel de Sant'Ana¹, Leonardo Santos Assunção², Patricia T. Bozza² and Kelly Grace Magalhães^{1*}

¹Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, ²Laboratory of Immunopharmacology, Instituto de Oswaldo Cruz—Floresta, Rio de Janeiro, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Guochang Hu,
University of Illinois at Chicago,
United States

Reviewed by:

Mausita Karmakar,
Case Western Reserve University,
United States
Samthambay Jay Jayasodan,
Louisiana State University,
United States

*Correspondence:

Kelly Grace Magalhães
kalmagalhães@unb.br

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 17 July 2019

Accepted: 28 November 2019

Published: 09 January 2020

Citation:

Corrêa R, Silva LFF, Ribeiro DJ, Almeida RN, Santos IO, Corrêa LH, Sant'Ana LP, Assunção LS, Bozza PT and Magalhães KG (2020) Lysophosphatidylcholine Induces NLRP3 Inflammasome-Mediated Foam Cell Formation and Pyroptosis in Human Monocytes and Endothelial Cells. *Front. Immunol.* 10:2927. doi: 10.3389/fimmu.2019.02927

Foam cells are specialized lipid-loaded macrophages derived from monocytes and are a key pathological feature of atherosclerotic lesions. Lysophosphatidylcholine (LPC) is a major lipid component of the plasma membrane with a broad spectrum of proinflammatory activities and plays a key role in atherosclerosis. However, the role of LPC in lipid droplet (LD) biogenesis and the modulation of inflammasome activation is still poorly understood. In the present study, we investigated whether LPC can induce foam cell formation through an analysis of LD biogenesis and determined whether the cell signaling involved in this process is mediated by the inflammasome activation pathway in human endothelial cells and monocytes. Our results showed that LPC induced foam cell formation in both types of cells by increasing LD biogenesis via a NLRP3 inflammasome-dependent pathway. Furthermore, LPC induced pyroptosis in both cells and the activation of the inflammasome with IL-1 β secretion, which was dependent on potassium efflux and lysosomal damage in human monocytes. The present study described the IL-1 β secretion and foam cell formation triggered by LPC via an inflammasome-mediated pathway in human monocytes and endothelial cells. Our results will help improve our understanding of the relationships among LPC, LD biogenesis, and NLRP3 inflammasome activation in the pathogenesis of atherosclerosis.

Keywords: lysophosphatidylcholine, foam cells, lipid droplet, inflammasome, NLRP3, atherosclerosis

INTRODUCTION

Atherosclerosis is caused by a proinflammatory process (1) mediated by the deposition of excess lipids in the arterial intima (2), resulting in the development of lesions in the arterial walls. These atherosclerotic lesions are fibro-fatty plaques in the intima of arteries (3) characterized by abundant cells with multiple lipid droplets (LDs) in the cytoplasm. Owing to this foamy morphology, these enhanced LD-containing cells are called foam cells. Foam cells are fundamental components of the establishment and progression of atherosclerosis and leukocyte recruitment to the site of

Review Article



Obesity and Breast Cancer: The Role of Crown-Like Structures in Breast Adipose Tissue in Tumor Progression, Prognosis, and Therapy

Sara Socorro Faria , Luís Henrique Corrêa , Gabriella Simões Heyn ,
Lívia Pimentel de Sant'Ana , Raquel das Neves Almeida ,
Kelly Grace Magalhães

Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

OPEN ACCESS

Received: May 30, 2019

Accepted: Apr 15, 2020

Correspondence to

Kelly Grace Magalhães

Laboratory of Immunology and Inflammation,
Department of Cell Biology, University of
Brasilia, DF, Brasilia 70910-900, Brazil.
E-mail: kellymagalhaes@unb.br

© 2020 Korean Breast Cancer Society
This is an Open Access article distributed
under the terms of the Creative Commons
Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)
which permits unrestricted non-commercial
use, distribution, and reproduction in any
medium, provided the original work is properly
cited.

ORCID iDs

Sara Socorro Faria
<https://orcid.org/0000-0003-2508-8160>
Luís Henrique Corrêa
<https://orcid.org/0000-0003-2825-0127>
Gabriella Simões Heyn
<https://orcid.org/0000-0001-7120-1086>
Lívia Pimentel de Sant'Ana
<https://orcid.org/0000-0003-2448-3927>
Raquel das Neves Almeida
<https://orcid.org/0000-0003-1829-8143>
Kelly Grace Magalhães
<https://orcid.org/0000-0002-7435-5272>

Conflict of Interest

The authors declare that they have no
competing interests.

<https://ejbc.kr>

ABSTRACT

Obesity is associated with increased risk and aggressiveness of many types of cancer. Women with obesity and breast cancer are more likely to be diagnosed with larger and higher-grade tumors and have higher incidence of metastases than lean individuals. Increasing evidence indicates that obesity includes systemic, chronic low-grade inflammation, and that adipose tissue can act as an important endocrine site, secreting a variety of substances that may regulate inflammation, immune response, and cancer predisposition. Obesity-associated inflammation appears to be initially mediated by macrophage infiltration into adipose tissue. Macrophages can surround damaged or necrotic adipocytes, forming "crown-like" structures (CLS). CLS are increased in breast adipose tissue from breast cancer patients and are more abundant in patients with obesity conditions. Moreover, the CLS index-ratio from individuals with obesity seems to influence breast cancer recurrence rates and survival. In this review, we discuss the most recent cellular and molecular mechanisms involved in CLS establishment in the white adipose tissue of women with obesity and their implications for breast cancer biology. We also explain how CLS influence the tumor microenvironment and affect breast cancer behavior. Targeting breast adipose tissue CLS can be a crucial therapeutic tool in cancer treatment, especially in patients with obesity.

Keywords: Adipocytes; Adipose tissue; Breast neoplasms; Macrophages; Obesity

INTRODUCTION

Overweight and obesity are major risk factors for cancer and chronic diseases such as diabetes, insulin resistance, and cardiovascular disease [1]. These conditions are currently on the rise in low- and middle-income countries. Obesity is characterized by an excessive accumulation of adipose tissue accompanied by systemic chronic inflammation, and it is associated with several types of cancer: breast, ovarian, liver, and pancreatic cancers, among others [2,3]. Overweight and obesity are defined by body mass index (BMI), the ratio between an individual's weight (in kilograms) and the square of their height (in meters). A person with

11. Aprovação no CEUA - UnB


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 24 de agosto de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA CAUSADA PELA INFECÇÃO COM O VÍRUS DA ZIKA EM CAMUNDONGOS**", Protocolo n.º 12/2017, sob responsabilidade da Professora Kelly Grace Magalhães foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Camundongo Isogênico C57BL/6 (48 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/03/2017 a 28/02/2019.


UnB


Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB


CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.