

ELIZABETH LOPES DE OLIVEIRA

**INFECÇÃO POR ZIKV E MAYV CAUSAM ALTERAÇÕES NA
MICROESTRUTURA TESTICULAR, POR MEIO DA MODULAÇÃO DO ESTADO
OXIDATIVO CAUSANDO REDUÇÃO DA PRODUÇÃO ESPERMÁTICA EM
CAMUNDONGOS BALB/C IMATUROS E ADULTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta

Coorientadora: Fernanda Carolina Ribeiro Dias

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48i
2022
Oliveira, Elizabeth Lopes de, 1989-
Infecção por ZIKV e MAYV causam alterações na
microestrutura testicular, por meio da modulação do estado
oxidativo causando redução da produção espermática em
camundongos Balb/c imaturos e adultos / Elizabeth Lopes de
Oliveira. – Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (149 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.653>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Arboviroses. 2. Espermatogênese em animais.
3. Infecundidade. I. Matta, Sérgio Luis Pinto da, 1950-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 579.2562

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

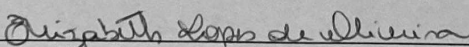
ELIZABETH LOPES DE OLIVEIRA

**INFECÇÃO POR ZIKV E MAYV CAUSAM ALTERAÇÕES NA
MICROESTRUTURA TESTICULAR, POR MEIO DA MODULAÇÃO DO ESTADO
OXIDATIVO CAUSANDO REDUÇÃO DA PRODUÇÃO ESPERMÁTICA EM
CAMUNDONGOS BALB/C IMATUROS E ADULTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

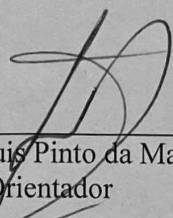
APROVADA: 04 de agosto de 2022.

Assentimento:



Elizabeth Lopes de Oliveira

Autora



Sérgio Luis Pinto da Matta

Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua presença constante em minha vida.

Ao meu marido Willian, pelo companheirismo.

Ao meu orientador Prof. Sérgio, pela confiança, ensinamentos e conselhos, aprendi muito com você.

À Fernanda minha coorientadora e amiga, obrigada por estar sempre presente, por todo apoio e dedicação.

À Ana Luiza, Grasielle, Luiz Otávio e Renner pela amizade, comprometimento com a pesquisa e pelas horas descontraídas.

Aos estagiários João Vitor, Mariana e Bárbara, obrigada pela confiança e comprometimento com o trabalho.

Aos Laboratórios de Imunovirologia da Universidade Federal de Viçosa coordenado pelo professor Sérgio Oliveira de Paula e o Laboratório Microscopia Eletrônica, do Instituto Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, coordenado professor Luiz Carlos Alves por conceder os vírus e estrutura necessária para realizar parte da pesquisa.

À Universidade Federal de Viçosa e o Departamento de Biologia Geral, por oferecer toda estrutura necessária para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

OLIVEIRA, Elizabeth Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Infecção por ZIKV e MAYV causam alterações na microestrutura testicular, por meio da modulação do estado oxidativo causando redução da produção espermática em camundongos Balb/c imaturos e adultos.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadora: Fernanda Carolina Ribeiro Dias.

O processo inflamatório proveniente das infecções virais está entre as principais causas de infertilidade masculina e, anualmente, 1 bilhão de pessoas são infectadas e 1 milhão vão a óbito em decorrência de infecções por arbovírus transmitidos por artrópodes hematófagos. O *Aedes aegypti* é a espécie mais eficiente no processo de transmissão das doenças arbovirais, como Zika vírus (ZIKV) e Mayaro (MAYV). Neste contexto, avaliamos os efeitos das infecções causadas pelo vírus ZIKV e MAYV no sistema reprodutor masculino de camundongos Balb/c imaturos e adultos infectados pela via direta. Oitenta camundongos foram divididos em 10 grupos experimentais (n=8/grupo), sendo os grupos de animais infectados imaturos (15 dias de idade): Controle 15 dias, MAYV 15dpi (dias pós-infecção), ZIKV 15dpi, Controle 45 dias, MAYV 45dpi e ZIKV 45dpi; Grupos de animais adultos (infectados com 60 dias de idade): Controle, Dexa (fosfato de dexametasona), ZIKV e MAYV (analisados 42 dpi). Observou-se que os vírus causaram atraso no desenvolvimento do túbulo seminífero, estresse oxidativo e nitrosativo. Os vírus causaram redução de espermátides no testículo, espermatozoides no epidídimo e, produção espermática diária, assim como e alterações do tempo de trânsito epididimário. Também causaram redução na integridade de membrana e motilidade espermática, aumento de histopatologias com aumento de danos iniciais e morte celular e redução dos componentes do intertúbulo. Portanto, os resultados indicam que o ZIKV e MAYV causam danos semelhantes ao sistema reprodutor, com algumas particularidades como o efeito do MAYV nas células de Leydig e o atraso no tempo de trânsito causado pelo ZIKV.

Palavras-chave: Arbovirose. Espermatogênese. Fertilidade. Reprodução. Desenvolvimento.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Elizabeth Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2022. **ZIKV and MAYV infection alter testicular microstructure by modulating the oxidative state of reduction by reducing immature and adult Balb/c sperm production.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-adviser: Fernanda Carolina Ribeiro Dias.

The inflammatory process resulting from viral infections is among the main causes of infertility and, annually, billions of people are infected and more than a million people are infected and more than a million occurrences of arbovirus infections are caused by major hematophagous viruses. *Aedes aegypti* is the most efficient species in the transmission process of arboviral diseases, such as Zika virus (ZIKV) and Mayaro (MAYV). In this context, the effects of the consequences of the world were affected by the MAYV virus. Eighty mice were divided into 10 experimental groups (n=8/group), with the groups of infected immature animals (15 days of age): Control 15 days, MAYV 15dpi (days post-infection), ZIKV 15dpi, Control 45 days, MAYV 45dpi and ZIKV 45dpi; Adult animal groups (infected at 60 days of age): Control, Dexa (dexamethasone phosphate), ZIKV and MAYV (analyzed 42 dpi). It was observed that the viruses caused a delay in seminiferous tubule development and oxidative and nitrosative stress. The viruses caused a reduction in spermatids in the testis, spermatozoa in the epididymis, daily sperm production, and changes in epididymal transit. It also causes a reduction in the reduction of membrane damage and motility, increases in its increases with increased cell death and early intertubular components. Therefore, the results indicate that ZIKV and MAYV cause similar damage to the reproductive system, with some particularities such as the effect of MAYV on Leydig cells and the delay in transit time caused by ZIKV.

Keywords: Arboviruses. Spermatogenesis. Fertility. Reproduction. Development.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	8
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivos gerais.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
3.1. Arbovírus.....	11
3.2. Zika vírus (ZIKV).....	12
3.3. Mayaro (MAYV).....	13
3.4. Testículos e espermatogênese.....	15
3.5. Efeitos dos vírus ZIKV e MAYV no sistema reprodutor masculino.....	16
4. REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 1	24
Infecção por MAYV em camundongos Balb/c imaturos causa atraso no desenvolvimento testicular com consequente redução na produção espermática	24
RESUMO	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO 2	59
Infecção por ZIKV em camundongos Balb/c imaturos provoca atraso no desenvolvimento tubular com quadro de estresse oxidativo alterando a produção e os parâmetros espermáticos	59
RESUMO	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	62
RESULTADOS	69

DISCUSSÃO	83
CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	88
CAPÍTULO 3	92
Estresse oxidativo e nitrosativo gerado pela infecção por MAYV em camundongos adultos altera parâmetros espermáticos em camundongos Balb/c adultos	92
RESUMO	93
INTRODUÇÃO	94
MATERIAL E MÉTODOS	95
RESULTADOS	102
DISCUSSÃO	113
CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS	117
CAPÍTULO 4	121
A infecção por ZIKV altera parâmetros espermáticos de camundongos Balb/c adultos	121
RESUMO	122
INTRODUÇÃO	123
MATERIAL E MÉTODOS	124
RESULTADOS	131
DISCUSSÃO	141
CONCLUSÕES	144
CONCLUSÃO GERAL	145
REFERÊNCIAS	146

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os danos causados nos órgãos reprodutores masculinos podem ser decorrentes de infecções sistêmicas, ou no próprio trato genital, pelo qual o vírus tenha tropismo (Fijak et al., 2018). A infertilidade masculina causada por patógenos pode acontecer por diferentes fatores, como por deterioração da integridade de membrana do espermatozoide ou por distúrbios das glândulas acessórias e na espermatogênese, além de afetar também a esteroidogênese (Fijak et al., 2018). Os índices de fertilidade masculina estão caindo e casais em idade reprodutiva que não conseguem conceber filhos de modo natural fazem parte de 15% da população, sendo 50% deles por causas de infertilidade masculina (Liu et al., 2018).

Anualmente, cerca de 1 bilhão de pessoas são contaminadas e 1 milhão vão a óbito em decorrência de infecções por arbovírus transmitidos por artrópodes hematófagos (OMS). Dentre os transmissores, destaca-se o *Aedes aegypti*, a espécie mais eficiente no processo de transmissão das doenças arbovirais, como Zika, Dengue, Chikungunya e Mayaro (Lopes et al., 2014; Leta et al., 2018). As arboviroses estão se tornando uma preocupação global por sua rápida disseminação geográfica, devido ao aumento do comércio e das viagens internacionais. Um estudo realizado em 2015 mapeou a distribuição global do *Aedes aegypti*, sendo constatado que a faixa de adequação de habitat para esta espécie é a mais ampla, ocorrendo em todos os continentes (Kraemer et al., 2015).

O arbovírus Zika (ZIKV), pertencente à família *Flaviviridae*, é transmitido por intermédio dos artrópodes e animais vertebrados, e tem os humanos como reservatório temporário (Enfissi et al., 2016). Em estudos realizados com modelos de animais infectados, a transmissão vertical levou ao desenvolvimento da microcefalia (Gubler, 2002; Novella et al., 2012; Kenney & Brault, 2014). Outros estudos evidenciaram a presença de cargas virais no sêmen, indicando uma via diferente da infecção no trato reprodutor masculino (Didier & Musso, 2016). O mecanismo usado pelo ZIKV para conseguir infectar uma célula depende da disponibilidade do receptor da família Axl TAM (Tyro3, Axl e Mer), presente em células de Sertoli e de Leydig, sendo menos expressa na última (Lemke & Rothlin, 2008; Kumar et al., 2018).

Outro arbovírus existente é o Mayaro (MAYV), pertencente à família *Togaviridae*, cujo principal vetor é o mosquito do gênero *Haemagogus*, mas que também pode ser transmitido pelo *Aedes aegypti* (Lopes et al., 2014). Foi identificado que o MAYV utiliza o receptor MXRA8, também conhecido como DICAM, ASP3 ou limitrina, para infectar as células (Zhang et al., 2018). No sistema reprodutor, o MXRA8 pode desempenhar papel

importante na espermatogênese, síntese e secreção de andrógenos (Bo et al., 2020). Esse receptor é encontrado em mamíferos, aves e anfíbios, expresso por células epiteliais, possuindo homologia com a molécula de adesão juncional e estando colocalizado com as proteínas da zônula de oclusão (ZO-1) (Jung et al., 2008; Han et al., 2013; Ribeiro-Filho et al., 2021). O epitélio seminífero é um lugar rico em zônulas de oclusão, produzidas pelas células de Sertoli que promovem o ambiente imunológico privilegiado para proteger as células germinativas haploides, formando a barreira hematotesticular, que divide o epitélio seminífero em dois ambientes, basal e adluminal (Siu & Cheng, 2004).

O surgimento de surtos dessas arboviroses pode estar relacionado a variações climáticas, degradação ambiental e distúrbios socioeconômicos, com aumentada sua distribuição geográfica, podendo causar grandes impactos à saúde reprodutiva humana (Weaver & Reisen, 2010). Neste contexto, avaliamos os efeitos das infecções causadas pelos arbovírus ZIKV e MAYV no sistema reprodutor masculino de camundongos Balb/c imaturos e adultos, infectados pela via direta, ou seja, o macho entra em contato direto com o vírus. Avaliamos também como esta infecção afeta o funcionamento do sistema reprodutor masculino, bem como as alterações da qualidade espermática desses animais, com o intuito de identificar os danos causados pelo ZIKV e o MAYV.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente estudo visou avaliar os efeitos dos vírus Zika e Mayaro em camundongos Balb/c machos imaturos e adultos nas porções gametogênica, androgênica testicular e no epidídimo.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a titulação viral;
- Obter os pesos corporal e testicular;
- Obter a proporção de túbulos em formação;
- Realizar estereologia dos componentes testiculares;
- Mensurar a altura do epitélio seminífero e o diâmetro dos túbulos seminíferos;
- Calcular o comprimento total dos túbulos seminíferos e a produção espermática diária total por testículo e por grama de testículo;
- Realizar a morfometria das células de Sertoli e células de Leydig;
- Avaliar alterações histopatológicas no testículo;
- Quantificação de células viáveis;
- Avaliação Espermática:
 - Motilidade espermática, integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides; produção diária, número de espermatozoides, e tempo de trânsito epididimário;
- Realizar análises bioquímicas:
 - Variações dos Níveis de Malondialdeído e óxido nítrico;
 - Estresse oxidativo: SOD, CAT e GST;
- Determinar a capacidade antioxidante total no soro.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Arbovírus

Os arbovírus pertencem ao grupo de vírus transmitidos por artrópodes hematófagos. O vírus fica alojado nas glândulas salivares do mosquito e é transmitido pela picada. Parte do ciclo de vida replicativo do vírus ocorre nos insetos, podendo ser transmitido para humanos e animais endotérmicos (Figura 1). Os arbovírus que causam doenças a humanos e animais endotérmicos pertencem a cinco famílias virais: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (Rust, 2012; Lopes *et al.*, 2014 e Souza, 2019).

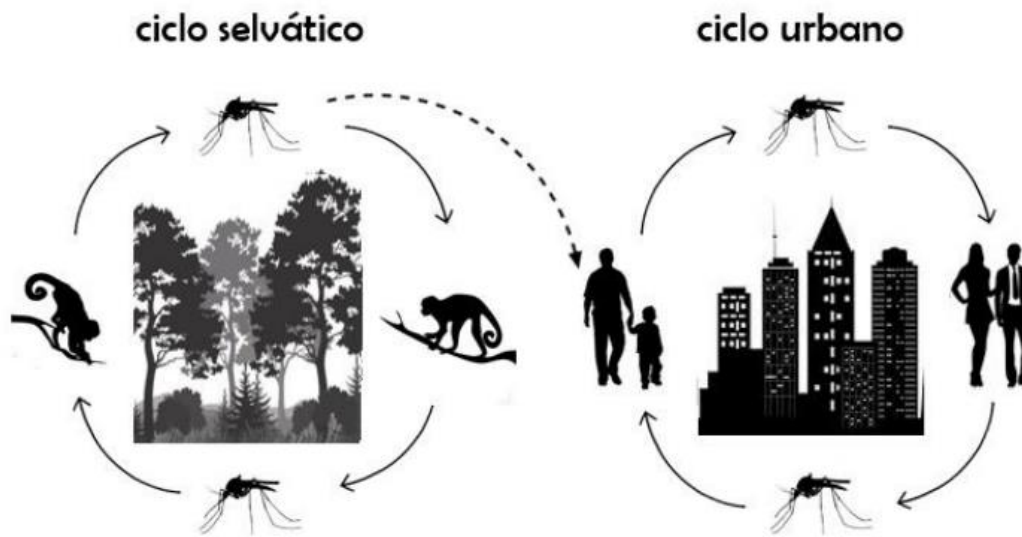


Figura 1: Ciclos selvático e urbano dos arbovírus. Fonte: Souza, 2019.

Fatores ambientais, como a temperatura, precipitação e tipo de vegetação, restringem a distribuição geográfica dos arbovírus. Esses fatores são limitantes para a distribuição dos vetores e dos vertebrados, que são importantes reservatórios necessários para a continuidade do ciclo de replicação do vírus (Gubler, 2001). A amplificação e a transmissão das arboviroses estão aumentando em consequência das variações climáticas, do desmatamento, do crescimento populacional de países tropicais em desenvolvimento e da ocupação desordenada, tornando-se constante ameaça à saúde humana (Lopes *et al.*, 2014).

Atualmente, 537 espécies de arbovírus estão registradas no Catálogo Internacional de Arbovírus, das quais mais de 150 são de origem zoonótica e oferecem riscos à saúde humana. Na maioria dos casos, os humanos infectados são hospedeiros sem saída, não transmitem o vírus a outras pessoas e não são reservatórios para a reinfecção dos mosquitos (Cleton *et al.*, 2012). A maioria das infecções causadas por arbovírus são assintomáticas ou apresentam

sintomas como febre inespecífica acompanhada de cefaleia, mialgia, mal-estar e prostração. Porém, os *Alfavírus* e *Flavivírus*, pertencentes às famílias *Togaviridae* e *Flaviviridae*, respectivamente, são causadores de doenças no sistema nervoso, responsáveis por causar a febre hemorrágica ou meningoencefalite, podendo levar à morte ou deixar sequelas neurológicas graves (Gubler, 2001; Weaver & Barrett, 2004).

3.2 Zika vírus (ZIKV)

O Zika vírus é um *Flavivírus* de RNA fita simples e envelopado (Prasad et al., 2017). Transmitido por mosquitos, seu ciclo de transmissão inclui principalmente vetores do gênero *Aedes* e macacos, ao passo que os humanos são hospedeiros eventuais (Hayes, 2009). O primeiro isolamento do ZIKV foi realizado em 1947, durante uma pesquisa sobre a epidemiologia da febre amarela e se deu através de um macaco *Rhesus* em cativeiro na floresta de Zika, Uganda (Dick *et al.*, 1952). Posteriormente, em 1954, foi registrado o primeiro caso da infecção por Zikv em humanos, na Uganda e na Nigéria (Macnamara, 1954).

Durante 50 anos, menos de 20 casos de infecções causadas pelo ZIKV em humanos foram registrados (Musso & Gubler, 2016). Em 2007, ocorreu um surto de infecções por ZIKV na ilha de YAP, oeste do Oceano Pacífico e nos Estados Federados da Micronésia (Duffy et al., 2009). Novas epidemias de maiores proporções ocorreram na Polinésia Francesa, no Pacífico Sul em 2013 e 2014 (Cao-Lormeau, 2014) e na América do Sul (Brasil) em 2015 (Matusali et al., 2018). Em 2015 houve também pequenos surtos do vírus no Pacífico, como na Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa, Vanuatu, Ilhas Salomão, Samoa e Fiji (Musso & Gubler, 2016). Várias doenças foram relacionadas ao surgimento do ZIKV, como complicações neurológicas graves, síndrome de Guillain-Barré em adultos na Polinésia Francesa (Oehler et al., 2014) e microcefalia em recém-nascidos no Brasil (Schuler-Faccini et al., 2016) (Figura 2).

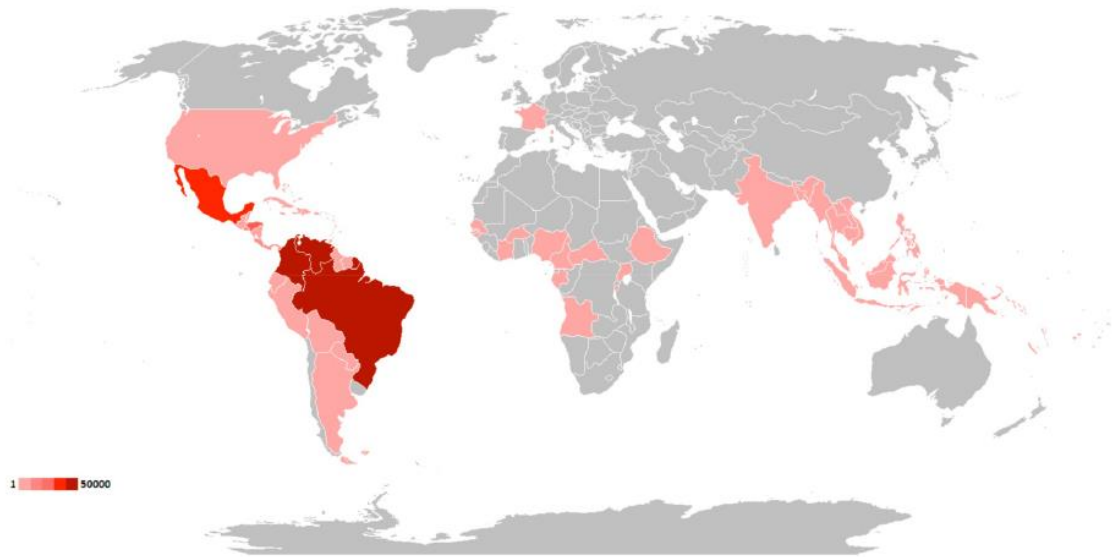


Figura 2: Distribuição global do ZIKV. Fonte: Puntasecca et al., 2021

A transmissão vertical em humanos pode causar aborto precoce ou más formações de níveis leves a graves, incluindo deficiência visual e auditiva (Brasil et al., 2016). Já foi descrito que no período pós-natal, a infecção congênita causada pelo ZIKV é associada à diminuição cerebral total, anormalidades oftalmológicas, interrupção da microarquitetura óssea e alterações na morfologia testicular, mas as consequências em longo prazo ainda não foram descritas (Camargos et al., 2019).

3.3 Mayaro (MAYV)

O MAYV é um *Alphavirus* de RNA de fita simples com envelope (Auguste et al., 2015). Pertence à família *Togaviridae*, tendo sido isolado pela primeira vez em 1954 de trabalhadores em Trinidad e Tobago e, mais tarde, de outros indivíduos da área do Rio Guamá, no estado do Pará, Brasil, que apresentavam febre e dor de cabeça na região frontal (Lopes et al., 2014). Os casos de MAYV em humanos estavam limitados às Américas Central e do Sul, nas regiões do rio Amazonas e seus afluentes (Mackay & Arden, 2016). Porém, já houve relatos da presença do vírus no México, demonstrando que o seu alcance está aumentando (Figura 3) (Espinosa & Dantes, 2006; Mavian et al., 2017).

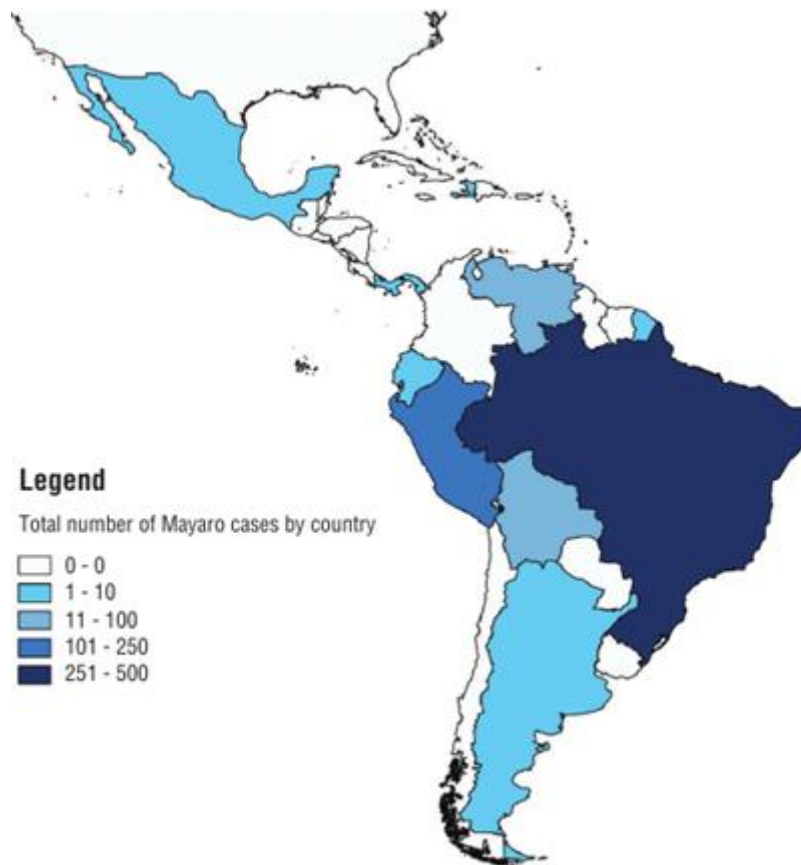


Figura 3: Número total de casos confirmados de Mayaro de 1954 até maio de 2019. Fonte: Ganjian & Riviere-Cinnamond, 2020 (Adaptado).

Ao longo do tempo, foi observado que novas espécies de mosquitos podem estar envolvidas no ciclo de transmissão, quando o vírus é introduzido em novos ambientes (Marcondes et al., 2017), como no caso do vírus chikungunya (CHIKV) e ZIKV, que se espalharam rapidamente para outros países, afetando a saúde de milhões de pessoas. Estes países podem tornar-se áreas de alto risco para outras infecções, como o MAYV, porém, seu diagnóstico é semelhante ao do CHIKV, sendo muito fácil de confundir (Acosta-Ampudia et al., 2018).

O MAYV tem como principal vetor mosquitos do gênero *Haemagogus*, que habitam florestas tropicais. Seus hospedeiros são os mamíferos que servem como reservatórios para a transmissão viral. O vírus também pode ser transmitido por mosquitos *Aedes aegypti*, facilitando a sua disseminação para grandes áreas urbanas (Lopes et al., 2014).

São diversos os sintomas causados pelo MAYV e o indivíduo infectado pode apresentar febre, cefaleia, mialgia, erupção cutânea, dores nas articulações e artrite (Mourão

et al., 2012; Santos *et al.*, 2019). A transmissão pode ocorrer durante todo o ano, mas são nos períodos chuvosos que a maioria das ocorrências acontecem, sendo esta uma semelhança com o vírus da dengue. Em Manaus, estado do Amazonas, o número de pessoas infectadas tem se tornado um grande problema à saúde pública, pois, ainda não existe uma vacina e o controle de vetores não é eficiente (Mourão *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2014).

3.4 Testículos e espermatogênese

Nos mamíferos, o testículo é dividido em dois compartimentos: o intertubular ou intersticial, e o compartimento dos túbulos seminífero ou tubular (Russell *et al.*, 1990). O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo, ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998). Estes túbulos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares: as células germinativas, originárias do epiblasto, e as células de Sertoli, provenientes do epitélio celomático (Karl & Capel, 1998). As células de Sertoli constituem um importante componente estrutural dos túbulos seminíferos. Através de seus receptores para o hormônio folículo estimulante (FSH), a célula de Sertoli controla o início da espermatogênese e faz a regulação da mesma (Baccetti *et al.*, 1998; Chui *et al.*, 2011).

Os componentes do compartimento intertubular, ou intertúbulo, são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável no tecido conjuntivo, constituída principalmente de fibroblastos e macrófagos (Russell *et al.*, 1990). A célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais frequente do intertúbulo. Esta célula contém receptores para hormônio luteinizante (LH) e apresenta marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol. Dentre os andrógenos incluem-se a di-hidrotestosterona, responsável pela diferenciação dos órgãos genitais masculinos e a testosterona, responsável pela masculinização do feto, desenvolvimento da genitália interna, aparecimento dos caracteres sexuais secundários e manutenção da espermatogênese a partir da puberdade (Teerds *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2011).

A espermatogênese dura de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (Russell *et al.*, 1990), sendo um processo complexo e bem organizado de divisões celulares que ocorre no interior dos túbulos seminíferos. Este processo é inteiramente regulado por hormônios (Hedger & Winnall, 2012) e pode sofrer alterações por diversos fatores, como doenças,

tóxicos ambientais, medicamentos e fitoterápicos (Monteiro et al., 2008; Melo et al., 2010; Heng et al., 2012).

3.5 Efeitos dos vírus ZIKV e MAYV no sistema reprodutor masculino

A infecção causada pelo ZIKV geralmente é considerada leve em humanos, mas, em alguns casos, pode estar relacionada a complicações neurológicas graves e interferência no desenvolvimento fetal (D'Ortenzio et al., 2016). O principal modo de transmissão do ZIKV ocorre através do contato com mosquitos *A. aegypti* infectados, embora existam evidências da transmissão através de relações sexuais (Mccarthy, 2016).

O caso de um homem de 32 anos, que apresentou quadro clínico típico de infecção causada por arbovírus, foi investigado dois dias após o retorno dele à França, vindo do Brasil e Guiana Francesa. Amostras de sangue, urina e sêmen foram coletadas após ser comprovado infecção por ZIKV, sendo que a carga viral do sêmen foi 100.000 vezes maior que a do sangue ou da urina em mais de duas semanas após o início da infecção, sugerindo que o ZIKV é um patógeno sexualmente transmissível (Mansuy et al., 2016). Em outro estudo, foi observada a persistência do ZIKV no testículo e epidídimo de camundongos infectados, havendo lesão tecidual e diminuição dos níveis de testosterona e inibina B, causando oligospermia. Espermatogônias, espermatócitos primários e células de Sertoli foram infectadas, ocasionando destruição dos túbulos seminíferos, além das células de Leydig e células peritubulares também serem afetadas (Govero et al., 2016).

O MAYV utiliza o receptor MXRA8 como meio de entrada na célula e este está colocalizado nas proteínas das zônulas de oclusão, local rico entre as células de Sertoli para formar a barreira hematotesticular e assim proteger as células germinativas haploides em desenvolvimento (Jung et al., 2008). Neste contexto, torna-se necessário estudar o MAYV, devido a sua capacidade de comprometer a estrutura do epitélio germinativo e interferir no processo espermatogênico.

4. REFERÊNCIAS

- Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J. M., & Ramírez-Santana, C. (2018). Mayaro: an emerging viral threat? *Emerging Microbes and Infections*, 7(1).
- Auguste, A. J., Liria, J., Forrester, N. L., Giambalvo, D., Moncada, M., Long, K. C., Morón, D., de Manzione, N., Tesh, R. B., Halsey, E. S., Kochel, T. J., Hernandez, R., Navarro, J. C., & Weaver, S. C. (2015). Evolutionary and ecological characterization of mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1742–1750.
- Baccetti, B., Collodel, G., Costantino-Ceccarini, E., Eshkol, A., Gambera, L., Moretti, E., Strazza, M., & Piomboni, P. (1998). Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis. *The FASEB Journal*, 12(11), 1045–1054.
- Bo, D., Jiang, X., Liu, G., Xu, F., Hu, R., Wassie, T., Chong, Y., Ahmed, S., Liu, C., & Girmay, S. (2020). Multipathway synergy promotes testicular transition from growth to spermatogenesis in early-puberty goats. *BMC Genomics*, 21(1), 1–16.
- Brasil, P., Pereira, J. P., Moreira, M. E., Ribeiro Nogueira, R. M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R. S., Valderramos, S. G., Halai, U.-A., Salles, T. S., Zin, A. A., Horovitz, D., Daltro, P., Boechat, M., Raja Gabaglia, C., Carvalho de Sequeira, P., Pilotto, J. H., Medialdea-Carrera, R., Cunha, C.D., Abreu de Carvalho, L.M., Pone, M., Siqueira, A. M., Calvet, G. A., Baião, A. E. R., Neves, E.S., Carvalho, P. R. N., Hasue, R. H., Marschik, P. B., Einspieler, C., Janzen, C., Cherry, J. D., Bispo de Filippis, A. M., Nielsen-Saines, K. (2016). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2321–2334.
- Camargos, V. N., Foureaux, G., Medeiros, D. C., da Silveira, V. T., Queiroz-Junior, C. M., Matosinhos, A. L. B., Figueiredo, A. F. A., Sousa, C. D. F., Moreira, T. P., Queiroz, V. F., Dias, A. C. F., Santana, K. T. O., Passos, I., Real, A. L. C. V., Silva, L. C., Mourão, F. A. G., Wnuk, N. T., Oliveira, M. A. P., Macari, S., Silva, T., Garlet, G. P., Jackman, J. A., Soriani, F. M., Moraes, M. F. D., Mendes, E. M. A. M., Ribeiro, F.M., Costa, G. M. J., Teixeira, A. L., Cho, N.J., Oliveira, A. C. P., Teixeira, M. M., Costa, V. V., Souza, D. G. (2019). In-depth characterization of congenital Zika syndrome in immunocompetent mice: Antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy. *EBioMedicine*, 44, 516–529.

- Cao-Lormeau, V. M. (2014). RE: Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), 1960.
- Chui, K., Trivedi, A., Cheng, C. Y., Cherbavaz, D. B., Dazin, P. F., Huynh, A. L. T., Mitchell, J. B., Rabinovich, G. A., Noble-Haeusslein, L. J., & John, C. M. (2011). Characterization and functionality of proliferative human Sertoli cells. *Cell Transplantation*, 20(5), 619–635.
- Cleton, N., Koopmans, M., Reimerink, J., Godeke, G. J., & Reusken, C. (2012). Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of Clinical Virology*, 55(3), 191–203.
- D’Ortenzio, E., Matheron, S., de Lamballerie, X., Hubert, B., Piorowski, G., Maquart, M., Descamps, D., Damond, F., Yazdanpanah, Y., & Leparc-Goffart, I. (2016). Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *New England Journal of Medicine*, 374(22), 2195–2198.
- Dick G. (1952). Zika isolation and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509–520.
- Didier Musso, a D. J. G. (2016). Zika virus. *Molecular Detection of Human Viral Pathogens*, 29(3), 313–320.
- Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M., & Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536–2543.
- Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M., & Rousset, D. (2016). Zika virus genome from the Americas. *The Lancet*, 387(10015), 227–228.
- Fijak, M., Pilatz, A., Hedger, M. P., Nicolas, N., Bhushan, S., Michel, V., Tung, K. S. K., Schuppe, H. C., & Meinhardt, A. (2018). Infectious, inflammatory and “autoimmune” male factor infertility: How do rodent models inform clinical practice? *Human Reproduction Update*, 24(4), 416–441.
- França, L.R.; Russell, L.D. The testis of domestic mammals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, F. (Eds.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications, p.197-219, 1998.

- Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S. M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D. J., Gorman, M. J., Richner, J. M., Caine, E. A., Salazar, V., Moley, K. H., & Diamond, M. S. (2016). Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*, 540(7633), 438–442.
- Gubler, D. J. (2001). Human arbovirus infections worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951, 13–24.
- Gubler, D. J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research*, 33(4), 330–342.
- Han, S. W., Jung, Y. K., Lee, E. J., Park, H. R., Kim, G. W., Jeong, J. H., Han, M. S., & Choi, J. Y. (2013). DICAM inhibits angiogenesis via suppression of AKT and p38 MAP kinase signalling. *Cardiovascular Research*, 98(1), 73–82.
- Hayes, E. B. (2009). Zika virus outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9), 1347–1350.
- Hedger, M. P., & Winnall, W. R. (2012). Regulation of activin and inhibin in the adult testis and the evidence for functional roles in spermatogenesis and immunoregulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 359(1–2), 30–42.
- Heng, K., Anand-Ivell, R., Teerds, K., & Ivell, R. (2012). The endocrine disruptors dibutyl phthalate (DBP) and diethylstilbestrol (DES) influence Leydig cell regeneration following ethane dimethane sulphonate treatment of adult male rats. *International Journal of Andrology*, 35(3), 353–363.
- Hongyu, K., Sandanielo, V. L. M., & Oliveira-Jr, G. J. (2015). Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. (Principal Component Analysis: theory, interpretations and applications). *E&S - Engineering and Science*, 1(August), 83–90.
- Johnson, R.A., Wichern, D.W (1998). *Applied multivariate statistical analysis*. Madison: Prentice Hall International, 1998. 816p.
- Jung, Y. K., Jin, J. S., Jeong, J. H., Kim, H. N., Park, N. R., & Choi, J. Y. (2008). DICAM, a novel dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule interacts with $\alpha\beta$ 3 integrin. *Journal of Cellular Physiology*, 216(3), 603–614.
- Karl, J., & Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*, 203(2), 323–333.
- Kenney, J. L., & Brault, A. C. (2014). The role of environmental, virological and vector interactions in dictating biological transmission of arthropod-borne viruses by

- mosquitoes. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 89). Elsevier Inc.
- Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q. N., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R., Teng, H. J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife*, 4(JUNE2015), 1–18.
- Kumar, A., Jovel, J., Lopez-Orozco, J., Limonta, D., Airo, A. M., Hou, S., Stryapunina, I., Fibke, C., Moore, R. B., & Hobman, T. C. (2018). Human sertoli cells support high levels of zika virus replication and persistence. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11.
- Lemke, G., & Rothlin, C. V. (2008). Immunobiology of the TAM receptors. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 327–336. h
- Leta, S., Beyene, T. J., De Clercq, E. M., Amenu, K., Kraemer, M. U. G., & Revie, C. W. (2018). Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *International Journal of Infectious Diseases*, 67, 25–35.
- Liu, W., Han, R., Wu, H., & Han, D. (2018). Viral threat to male fertility. *Andrologia*, 50(11), 1–9.
- Lopes, N., Nozawa, C., & Linhares, R. E. C. (2014). Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 5(3), 55–64.
- MacNamara, F. N. (1954). Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(2), 139–145.
- Manly, B. F. J. *Multivariate statistical methods*. New York, Chapman and Hall, (1986).159 p.
- Mansuy, J. M., Dutertre, M., Mengelle, C., Fourcade, C., Marchou, B., Delobel, P., Izopet, J., & Martin-Blondel, G. (2016). Zika virus: High infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *The Lancet Infectious Diseases*, 16(4), 405.
- Marcondes, C. B., Contigiani, M., Gleiser, R. M., & Reisen, W. (2017). Emergent and reemergent arboviruses in South America and the Caribbean: Why so many and why now? *Journal of Medical Entomology*, 54(3), 509–532.
- Matusali, G., Houzet, L., Satie, A. P., Mahé, D., Aubry, F., Couderc, T., Frouard, J., Bourgeau, S., Bensalah, K., Lavoué, S., Joguet, G., Bujan, L., Cabié, A., Avelar, G.,

- Lecuit, M., Le Tortorec, A., & Dejucq-Rainsford, N. (2018). Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. *Journal of Clinical Investigation*, 128(10), 4697–4710.
- Mavian, C., Rife, B. D., Dollar, J. J., Cella, E., Ciccozzi, M., Prosperi, M. C. F., Lednicky, J., Morris, J. G., Capua, I., & Salemi, M. (2017). Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.
- McCarthy, M. (2016). Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 352(February), i720.
- Melo, F. C. S. A., Matta, S. L. P., Paula, T. A. R., Gomes, M. L. M., & Oliveira, L. C. (2010). The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. *Biological Research*, 43(4), 445–450.
- Monteiro, J. C., Predes, F. S., Matta, S. L. P., & Dolder, H. (2008). *Heteropterys aphrodisiaca* infusion reduces the collateral effects of cyclosporine a on the testis. *Anatomical Record*, 291(7), 809–817.
- Mourão, M. P. G., Bastos, M. D. S., De Figueiredo, R. P., Gimaque, J. B. L., Dos Santos Galusso, E., Kramer, V. M., De Oliveira, C. M. C., Naveca, F. G., & Figueiredo, L. T. M. (2012). Mayaro fever in the city of manaus, Brazil, 2007-2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1), 42–46.
- Musso, D; Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Molecular Detection of Human Viral Pathogens*, 29(3), 313–320.
- Novella, I. S., Presloid, J. B., Smith, S. D., & Wilke, C. O. (2012). Specific and nonspecific host adaptation during arboviral experimental evolution. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 21(1–2), 71–81.
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparc-Goffart, I., Lastãre, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H. P., Musso, D., & Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by guillain-barré syndrome -case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*, 19(9), 7–9.
- Prasad, V. M., Miller, A. S., Klose, T., Sirohi, D., Buda, G., Jiang, W., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2017). Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nature Structural and Molecular Biology*, 24(2), 184–186.
- Puntasecca, C. J.; King, C. H.; LaBeaud A. D. (2021). Measuring the global burden of chikungunya and Zika viruses: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 15(3), e0009055.

- Ribeiro-Filho, H. V., Coimbra, L. D., Cassago, A., Rocha, R. P. F., Guerra, J. V. da S., de Felicio, R., Carnieli, C. M., Leme, L., Padilha, A. C., Paes Leme, A. F., Trivella, D. B. B., Portugal, R. V., Lopes-de-Oliveira, P. S., & Marques, R. E. (2021). Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. *Nature Communications*, *12*(1), 1–13.
- Russell, L. D., Ettl, R. A., Hikim, A. P. S., Clegg, E. D. *Histological and Histopathological Evaluation of The Testis*. Cache River Press, Clearwater. 1990.
- Rust, R. S. (2012). Human Arboviral Encephalitis. *Seminars in Pediatric Neurology*, *19*(3), 130–151.
- Sandanielo, V. L. M. (2008). Emprego de técnicas estatísticas na construção de índices de desenvolvimento sustentável aplicados a assentamentos rurais. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônomicas Campus de Botucatu.p 175.(Tese, doutorado)
- Santos, F. M., Dias, R. S., de Oliveira, M. D., Costa, I. C. T. A., Fernandes, L. S., Pessoa, C. R., da Matta, S. L.P., Costa, V. V., Souza, D. G., da Silva, C. C., de Paula, S. O. (2019) Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. *3*;13(5), 1-20. e0007375.
- Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E. M., Feitosa, I. M. L., Horovitz, D. D. G., Cavalcanti, D. P., Pessoa, A., Doriqui, M. J. R., Neri, J. I., Neto, J. M. de P., Wanderley, H. Y. C., Cernach, M., El-Husny, A. S., Pone, M. V. S., Serao, C. L. C., & Sanseverino, M. T. V. (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *65*(3), 1–4.
- Siu, M. K. Y., & Cheng, C. Y. (2004). Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis. *BioEssays*, *26*(9), 978–992.
- Souza, A.F.P.D.V.B (2019). Estudos genômicos, filogenéticos e proteômicos (CHIKV e MAYV). Universidade de Brasília.p 92.(Dissertação, mestrado)
- Teerds, K. J., De Boer-Brouwer, M., Dorrington, J. H., Balvers, M., & Ivell, R. (1999). Identification of markers for precursor and Leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration. *Biology of Reproduction*, *60*(6), 1437–1445.
- Weaver, S. C., & Barrett, A. D. T. (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(10), 789–801.

- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2), 328–345.
- Ye, L., Su, Z. J., & Ge, R. S. (2011). Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules*, 16(12), 9983–10001.
- Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., Nair, S., Basore, K., Klimstra, W. B., Rimkunas, R., Fong, R. H., Lin, H., Poddar, S., Crowe, J. E., Doranz, B. J., Fremont, D. H., & Diamond, M. S. (2018). Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*, 557(7706), 570–574.

CAPÍTULO 1:

Infeção por MAYV em camundongos Balb/c imaturos causa atraso no desenvolvimento testicular com consequente redução na produção espermática

RESUMO

O arbovírus Mayaro (MAYV) é um *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae*, possui RNA de fita simples envelopado. Os sintomas causados pelo MAYV em humanos são febre, cefaleia, mialgia, erupção cutânea, dores nas articulações e artrite. O processo inflamatório proveniente de infecções virais está entre as principais causas de infertilidade masculina. Neste contexto, avaliamos os efeitos causados pela infecção por MAYV 15 e 45 dias pós-infecção (dpi), no sistema reprodutor masculino de trinta e dois camundongos Balb/c infectados com 15 dias de idade por via direta. Foram divididos em 4 grupos experimentais (n=8/grupo), sendo os grupos Controle 15dias e o Grupo MAYV 15dpi, e os grupos Controle 45 dias e Grupo MAYV 45dpi. Observou-se redução em todos os parâmetros biométricos e aumento do IGS. O MAYV provocou no compartimento tubular: atraso no desenvolvimento dos túbulos seminíferos, aumento da túnica própria, redução no percentual de lume, aumento no comprimento de túbulo por testículo, no índice mitótico e rendimento geral da espermatogênese. E no compartimento intertubular o MAYV provocou: redução dos componentes do intertúbulo, do diâmetro e volume de núcleo de Leydig, volume de Leydig por testículo e número de célula Leydig por testículo. Ainda, houve aumento de histopatologias e redução na viabilidade celular, redução no número de espermátides e espermatozoides e na motilidade espermática, e comprometimento na integridade de membrana dos espermatozoides. No testículo e epidídimo, observou-se alterações nas enzimas antioxidantes, e redução de NO e MDA. Concluimos que o MAYV é capaz de atrasar o desenvolvimento testicular, interfere no processo espermatogênico alterando a quantidade, qualidade e a motilidade espermática.

INTRODUÇÃO

Atualmente, 537 espécies de arbovírus estão registradas no Catálogo Internacional de Arbovírus, das quais mais de 150 são de origem zoonótica e oferecem riscos à saúde humana (Cleiton et al., 2012). Os arbovírus pertencem ao grupo de vírus transmitidos por artrópodes hematófagos. Por ter essa forma de transmissão, o surgimento e o aumento dos surtos causados podem estar relacionados às variações climáticas e degradação ambiental, aumentando a distribuição geográfica e causando grandes impactos à saúde reprodutiva humana (Weaver & Reisen, 2010; Souza, 2019).

O arbovírus Mayaro (MAYV) é um *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae* e possui RNA de fita simples envelopado. Foi identificado pela primeira vez em Trinidad e Tobago em 1954 e mais na área do Rio Guamá, no estado do Pará, Brasil. O principal vetor é mosquito do gênero *Haemagogus*, mas pode ser transmitido também pelo *Aedes aegypti* facilitando a disseminação para as áreas urbanas (Lopes et al., 2014; Auguste et al., 2015). Os sintomas causados pelo MAYV em humanos são febre, cefaleia, mialgia, erupção cutânea, dores nas articulações e artrite, a transmissão pode ocorrer durante todo o ano, mas são nos períodos chuvosos que a maioria das ocorrências acontecem, sendo esta uma semelhança com o vírus da dengue (Mourão et al., 2012; Lopes et al., 2014; Santos et al., 2019).

O processo inflamatório proveniente de infecções virais está entre as principais causas de infertilidade masculina. Os danos causados nos órgãos reprodutores masculinos podem ser decorrentes de infecções sistêmicas, onde a reprodução é afetada de maneira local ou indireta, quando ocorre no próprio trato genital masculino, pelo qual o vírus tenha tropismo (Fijak et al., 2018). A infertilidade masculina causada por patógenos pode acontecer por diferentes fatores, como por deterioração da integridade de membrana do espermatozoide, ou por distúrbios das glândulas acessórias e na espermatogênese, além de afetar também a esteroidogênese (Fijak et al., 2018). Os índices de fertilidade masculina estão caindo, e casais em idade reprodutiva que não conseguem conceber filhos de modo natural fazem parte de 15% da população, sendo 50% deles por causas de infertilidade masculina (Liu et al., 2018).

O MAYV utiliza o receptor MXRA8, também conhecido como DICAM, ASP3 ou limitrina, para infectar as células (Zhang et al., 2018). Encontrado em mamíferos, aves e anfíbios, este receptor é expresso por células epiteliais, possuindo homologia com a molécula de adesão juncional e estando colocalizado com as proteínas da zônula de oclusão (ZO-1) (Jung et al., 2008; Han et al., 2013; Ribeiro-Filho et al., 2021). O epitélio seminífero é um lugar rico em zônulas de oclusão, produzidas pelas células de Sertoli que promovem o

ambiente imunológico privilegiado para as células germinativas haploides, formando a barreira hematotesticular, é dividido em dois ambientes, basal e adluminal, sendo a principal função proteger as células germinativas (Siu & Cheng, 2004). O MAYV utiliza os macrófagos para a sua replicação (De Castro-Jorge et al., 2019), os macrófagos testiculares possuem digitações intracitoplasmáticas únicas conectadas fisicamente com as células de Leydig presentes no intertúbulo e, portanto possuem influência direta na fertilidade masculina (Hutson, 1992; Heinrich & DeFalco, 2020). Neste contexto, avaliamos os efeitos causados pela infecção por MAYV 15 e 45 dias pós-infecção (dpi), no sistema reprodutor masculino de camundongos Balb/c infectados com 15 dias de idade por via direta, ou seja, os animais tiveram contato direto com o vírus. Avaliamos também como esta infecção afeta o funcionamento do sistema reprodutor masculino em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como as alterações da qualidade espermática desses animais, com o intuito de identificar os danos causados pelo MAYV.

MATERIAL E MÉTODOS

Estoque e título viral

A cepa do vírus Mayaro (ATCC VR-66, strain TR 4675) foi propagada utilizando-se células de *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC CRL 1660), cultivada em meio L15 (Leibovitz) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em garrafas de 75 cm², a 28 °C.

O título viral foi determinado por meio da contagem de placas de lise. Para tal, células Vero (ATCC CCL-81) cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% SFB, foram plaqueadas em placas de 24 poços (2x10⁶ células) e mantidas a 37 °C e 5% CO₂ até atingirem cerca de 80% de confluência. Foi realizada a diluição seriada decimal de uma alíquota do estoque viral, aplicando-se 100µL de cada diluição em triplicata à placa. O controle positivo foi determinado como apenas células e meio, sem a adição do vírus. A placa foi incubada a temperatura ambiente, por 1 hora sob agitação constante, para adsorção viral. Após remoção do sobrenadante, 1mL de solução de CMC 3% (carboximetilcelulose 3% diluído em meio DMEM incompleto na proporção 1:2) foi adicionado a cada poço. A seguir, incubou-se a placa em estufa a 37°C e 5% CO₂, por 48 horas. Os efeitos citopáticos foram monitorados durante este período. Para a fixação das células, utilizou-se solução de formaldeído 20%, adicionando 1mL em cada poço. A placa foi incubada por 1 hora, a 37°C, e corada com cristal violeta 5%. O título viral foi determinado por meio da fórmula:

$$T = (m \times d)/v$$

Em que: T: título viral; m: média das placas de lise contadas; d: inverso da diluição escolhida. v: volume adicionado (mL).

O título viral foi expresso em Unidades Formadoras de Placa por mililitro (PFU/mL).

Grupos experimentais

O experimento seguiu as normas determinadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (protocolo 70/2019). Trinta e dois camundongos machos Balb/c (22 g; 15 dias de idade) foram divididos em 4 grupos experimentais (n=8/grupo), sendo os grupos de 15 dias pós-infecção (15dpi) o Controle e o Grupo MAYV 15dpi, e os grupos de 45 dias pós-infecção (45 dpi) o Controle e o Grupo MAYV 45dpi. Os animais de cada grupo foram alojados em gaiolas coletivas e eutanasiados com 30 e 60 dias de idade.

Os animais foram infectados por meio de uma seringa na região axilar e receberam 50µl de MAYV na concentração de $1,25 \times 10^7$ PFU.

Coleta do material biológico

Os animais de cada grupo foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte), anestesiados com tiopental (i.p., 30mg/kg) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado e centrifugado a $4.119 \times g$ por 15 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado em microtubos e congelado a -80°C . Os testículos foram retirados, dissecados e pesados, sendo 6 testículos (direitos) fixados em Karnovsky (glutaraldeído 4% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4) para análises histológicas e 6 testículos (esquerdos) congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer (-80°C) para análises de estresse oxidativo. Para a análise de trânsito espermático, 4 testículos e epidídimos foram armazenados a -20°C , e 5 epidídimos foram utilizados para análise de motilidade espermática e integridade de membrana.

Microscopia de luz

Fragmentos do testículo foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica). Secções de

3 μ m de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica), respeitando-se intervalos de 39 μ m entre os cortes, que foram corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. Imagens digitais foram obtidas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX -53, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan) e a morfometria foi realizada através do software Image J (National Institute of Health, USA).

Biometrias corporal e testicular

Depois de fixado, o testículo foi pesado. A albugínea foi retirada e pesada, descontando seu peso do peso testicular total, para obtenção do peso do parênquima testicular. Com o peso corporal e testicular foi calculado então o índice gonadossomático (IGS), que representa o percentual de peso corporal alocado em gônadas, a partir da fórmula: $IGS (\%) = (\text{Peso total das gônadas} / \text{Peso corporal}) \times 100$.

Através do peso do parênquima testicular (peso testicular – peso da albugínea) e do peso corporal foi calculado o índice parenquimossomático (IPS) através da equação: $IPS (\%) = (\text{Peso do parênquima dos testículos} / \text{Peso corporal}) \times 100$.

Proporção de túbulos seminíferos em formação

Para a proporção de túbulos seminíferos em formação foram contabilizados 200 túbulos dos animais 15 dpi, sendo os túbulos classificados da seguinte forma: com lume e sem lume.

Histomorfometria testicular

A proporção volumétrica dos componentes dos túbulos seminíferos foi calculada a partir de uma grade com 266 intercessões (pontos), em 10 campos aleatórios, totalizando 2660 pontos por animal. Foram contabilizados pontos sobre a túnica própria, epitélio seminífero, lúmen e intertúbulo. Para calcular a proporção volumétrica dos componentes testiculares foi utilizada a seguinte fórmula: $\text{Proporção volumétrica} (\%) = (\text{NT} / \text{NTT}) \times 100$, onde NT= Registro do número de pontos contados sobre o componente e NTT= Número de pontos totais contados.

O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado considerando o percentual ocupado por cada constituinte multiplicado pelo volume do parênquima testicular. Para o diâmetro tubular médio, foram medidos, aleatoriamente, 20 túbulos seminíferos que apresentavam forma mais circular possível. Para a altura do epitélio seminífero, a mensuração

se deu pela distância da túnica própria até o lúmen, em duas medidas diametralmente opostas, utilizando-se as mesmas secções transversais usadas para medir o diâmetro tubular.

Para os cálculos das áreas tubular (ART), luminal (ARL) e epitelial (ARE) , em μm^2 , foram utilizadas as seguintes equações: $\text{ART} = \pi \cdot \text{RT}^2$ (RT= raio tubular); $\text{ARL} = \pi \cdot \text{RL}^2$ (RL= raio luminal); $\text{ArE} = \text{ArT} - \text{ArLU}$. Também foi calculada a Relação T/E= ArT/ArE . O comprimento total dos túbulos seminíferos, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal (Dorst & Sajonski, 1974). O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da fórmula: $\text{CTT/g} = \text{Comprimento total de túbulos} / \text{Peso bruto dos testículos (g)}$.

Contagem das células no estágio 1

As células germinativas tais como espermatogônias do tipo A (A), espermatócitos primários em preleptóteno / leptóteno (PL / L), espermatócitos primários em paquíteno (P), espermatídes arredondadas (RS) e as células de Sertoli (S), foram quantificadas em secções transversais de 20 túbulos seminíferos no estágio I de cada animal. Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos das células germinativas e de 30 nucléolos das células de Sertoli. Os resultados foram corrigidos de acordo com as variações do tamanho das células e espessura do corte pela seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ corrigido} = \text{contagem obtida} \times \text{espessura do corte} / \text{espessura do corte} + (\sqrt{(\text{DM}/2)^2 - (\text{DM}/4)^2})$$

DM= diâmetro nuclear (nucleolar) médio.

Para avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli, foram estimadas razões a partir dos números corrigidos das células germinativas e de Sertoli (Dias et al., 2019). As seguintes razões foram utilizadas: coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL/L:SGA); rendimento geral da espermatogênese (EAR: SGA); índice meiótico (EAR:PAQ); índice de célula de Sertoli (EAR: SER); capacidade total de suporte da célula de Sertoli (SGA + PL/L + PAQ + EAR:SER).

O número de células de Sertoli foi estimado a partir do número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio I e do comprimento total de túbulos seminíferos segundo a fórmula: $\text{NCS} = (\text{CTS} (\mu\text{m}) \times \text{N}^\circ \text{ corrigido de nucléolos de cél. de Sertoli por secção transversal}) / \text{Espessura de corte} (\mu\text{m})$.

CTS= Comprimento total de túbulos seminíferos (μm).

A partir desse cálculo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo. A produção espermática diária (PED) foi calculada segundo Amann e Almquist (1961), de acordo com a fórmula:

$$\text{PED} = \text{Volume de túbulo seminífero } (\mu\text{m}^3) \times \text{Número corrigido de espermátides arredondadas} / \text{Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias)} \times \text{Área da secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 } (\mu\text{m}^2) \times \text{espessura do corte histológico } (\mu\text{m}).$$

Os valores por grama de testículo foram estimados dividindo a PDE pelo peso testicular.

Histopatologia testicular

Foram utilizados 200 túbulos seminíferos analisados aleatoriamente, por animal. As alterações patológicas existentes nos testículos foram classificadas utilizando-se o score descrito por Johnsen (1970), modificado para oito níveis (Dias et al., 2019): Nível 1- túbulos íntegros, com células germinativas dispostas no seu sítio de localização normal e poucos vacúolos; Nível 2- vacúolos na base do epitélio; Nível 3- vacúolos no ápice do epitélio; Nível 4- vacúolos na base e no ápice do epitélio; Nível 5- células germinativas no interior do lúmen e presença de células em processo de degeneração; Nível 6- epitélio apenas com células basais; Nível 7- epitélio apenas com células de Sertoli; Nível 8- túbulos seminíferos desprovidos de células de Sertoli ou germinativas. Os níveis foram agrupados como: normal (nível 1), com patologias leves (níveis 2 e 3), com patologias moderadas (níveis 4 e 5) e com patologias severas (níveis 6, 7 e 8).

Viabilidade das Células Germinativas

Para análise da viabilidade das células germinativas, os cortes histológicos de $1\mu\text{m}$ foram corados com laranja de acridina e iodeto de propídio. O laranja de acridina cora as células viáveis em verde, o iodeto de propídio cora as células cuja integridade de membrana foi perdida em vermelho, sendo essas células classificadas de acordo com a condensação e fragmentação do núcleo e com a integridade de membrana (Giri & Roy, 2016). Para classificar as células, os núcleos corados em verde são as células viáveis e os núcleos corados de amarelo a vermelho indicam processo de morte celular. As imagens foram feitas em

fotomicroscópio de fluorescência EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canada) e analisadas utilizando-se o software Image-Pro Plus.

Contagem de células no testículo e epidídimo

Foram contados os espermatozoides das regiões cabeça/corpo (C/C) e cauda (C) do epidídimo e as espermátides presentes no testículo que se mostraram resistentes à homogeneização. Os testículos foram pesados, retirada a cápsula albugínea e homogeneizados em 5 mL de NaCl 0,9% (Triton X-100 a 0,05%) por 3 minutos. Posteriormente, foram diluído 5 vezes (1:5) na mesma solução, transferidos para a câmara de Neubauer, e as espermátides resistentes foram contadas. Para o cálculo da produção espermática diária, o número de espermátides por testículo foi dividido por 4,84 (número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero de camundongos) (Robb et al., 1978; Fernandes et al., 2007). A cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram homogeneizados, sendo 200mg da cabeça/corpo e 100 mg da cauda em 1 ml de solução de NaCl a 0,9% (Triton X-100 a 0,05%) por 3 minutos. Em seguida, o homogenato da cabeça/corpo foi diluído 2 vezes (1:2), e o da cauda não passou por uma segunda diluição. Para o cálculo do tempo de trânsito em cada região epididimária em dias, o número total de espermatozoides de cada segmento foi dividido pela produção espermática diária (Robb et al., 1978; Fernandes et al., 2007).

Análise espermática

Para obtenção dos espermatozoides, a região da cauda do epidídimo foi seccionada em uma placa de Petri, utilizando uma lâmina de inox, diluído em 500 µL da solução Tris-citrato-frutose a 37 °C. Em seguida, 10µL foram usados para a avaliação da motilidade sendo calculada a proporção entre espermatozoides imóveis ou móveis em 3 campos aleatórios.

Para análise de integridade de membrana 10 µL de amostra foram adicionados em uma solução de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI) (Harrison & Vickers, 1990). Os espermatozoides foram classificados por possuírem membrana íntegra (CFDA + / PI-) e membrana não íntegra (CFDA-; PI +). Para a contagem foram analisados 200 espermatozoides, em microscópio de epifluorescência (610 nm, Olympus AX70 TRF, Tóquio, Japão), em aumento de 400x.

Histomorfometria Intertubular

A proporção volumétrica dos elementos do intertúbulo foi estabelecida pela contagem de 1000 pontos por animal, em imagens digitais do intertúbulo obtidas dos preparados histológicos. Foi lançada sobre a imagem uma grade com 600 intercessões (pontos), e os pontos incidentes sobre os elementos do tecido conjuntivo, macrófagos, vasos linfáticos, vasos sanguíneos, núcleo e citoplasma de Leydig foram contabilizados. Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula: $\text{Proporção volumétrica (\%)} = (\% \text{ proporção volumétrica de intertúbulo} \times \% \text{ proporção volumétrica do componente no intertúbulo}) / 100$. O volume (mL) dos componentes do intertúbulo nos testículos foi calculado pela equação: $\text{Volume} = \% \text{ do elemento nos testículos} \times \text{PPT} / 100$, onde: PPT= peso do parênquima testicular.

Para o cálculo do diâmetro nuclear da célula de Leydig foram medidos 30 núcleos esféricos, com nucléolo e cromatina perinuclear bem definidos. Foram então calculados os volumes (μm^3) nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e de cada célula de Leydig (VL) através das seguintes equações: $\text{VNL} = 4/3 \pi R^3$, onde R= Raio nuclear; $\text{VCL} = \% \text{ de citoplasma} \times \text{VNL} / \% \text{ de núcleo}$, $\text{VCL} = \text{VNL} + \text{VCL}$.

O volume ocupado pelas células de Leydig por testículo (VLT) foi calculado pela seguinte equação: $\text{VLT} (\mu\text{L}) = \text{Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular} \times \text{Peso do parênquima testicular (PPT)} / 100$. O volume das células de Leydig por grama de testículo (VL/gT) foi obtido pela equação: $\text{VL/gT} = \text{volume ocupado pela célula de Leydig por testículo (VLT)} / \text{peso bruto dos testículos (PT)}$. Os números de células de Leydig por testículo (NLT) e por grama de testículo (NLg/T) foram calculados pelas fórmulas: $\text{NLT} = \text{VLT} (\mu\text{m}^3) / \text{VL} (\mu\text{m}^3)$ e $\text{NLg/T} = \text{NLT} / \text{PT}$.

O índice Leydigossomático (ILS), que determina o percentual de massa corporal alocado em células de Leydig, foi calculado utilizando a fórmula: $\text{ILS} = \text{volume que as células de Leydig ocupam nos testículos} / \text{PC} \times 100$, onde PC= peso corporal.

Estresse Oxidativo

Os testículos foram homogeneizados em uma solução tampão fosfato de potássio (pH 7.4), na concentração de 100mg/1000 μL , e centrifugados a 13,8 G, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA), níveis de proteína total e de enzimas antioxidantes testiculares: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST). Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. Todas as atividades

enzimáticas foram determinadas em duplicata usando um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou um leitor ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A atividade de catalase (CAT) foi avaliada de acordo com o método descrito por Aebi (1984). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada nos sobrenadantes conforme o método descrito por Siddiqui et al. (2005) e da glutathione S-transferase (GST) pela formação conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig et al., 1974). Os níveis de malondialdeído (MDA), que é o produto da peroxidação lipídica, foram determinados utilizando-se a solução TBARS (ácido tricloroacético 15% / ácido tiobarbitúrico 0,375% / ácido clorídrico 0,25M). Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados de acordo com Gutteridge e Halliwell (1990). A concentração do óxido nítrico (NO) foi determinada indiretamente através do teor de nitrito/nitrato pela reação de Griess (Ricart-Jané et al., 2002). A proteína total foi mensurada utilizando albumina do soro bovino como curva padrão (Lowry et al., 1951), e utilizada para homogeneização dos dados de estresse oxidativo.

Determinação da capacidade antioxidante total (FRAP)

A capacidade antioxidante total foi estimada de acordo com a capacidade redutora férrica do plasma (FRAP) pelo método descrito por Benzie & Strain (1996), usando TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil) -s-triazina) como substrato.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, e posteriormente submetidos ao teste t, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média.

RESULTADOS

Biometria corporal e testicular

De acordo com os parâmetros biométricos, corporal e testicular, o grupo MAYV 15dpi apresentou queda nos pesos corporal, testicular, da albugínea e parênquima testicular, além da redução do IGS (Tabela 1). Os animais infectados com MAYV e analisados 45dpi apresentaram queda no peso corporal e peso da albugínea, havendo aumento no IPS (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros biométricos, corporais e testiculares, de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

	Controle 15dias	MAYV 15dpi	Controle 45dias	MAYV 45dpi
PC (g)	27,39±1,52	18,80±1,00 *	34,47±0,08	25,17±4,28 *
PT(g)	0,14±0,02	0,06±0,01 *	0,18±0,05	0,14±0,05
PA (g)	0,04±0,01	0,01±0,01 *	0,04±0,22	0,01±0,00 *
PP (g)	0,10±0,02	0,05±0,01 *	0,14±0,04	0,16±0,04
IGS (%)	0,51±0,09	0,33±0,07 *	0,47±0,19	0,69±0,14
IPS (%)	0,25±0,05	0,19±0,06	0,29±0,09	0,47±0,09 *

PC – Peso corporal; PT – Peso testicular; PA – Peso da albugínea; PP – Peso do parênquima testicular; IGS – Índice gonadossomático; IPS – Índice parenquimossomático; dpi – dias pós infecção. Dados expressos como média±DP. * entre tratamentos indica que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

Proporção de túbulos seminíferos em formação

Os animais do grupo MAYV 15dpi tiveram menor proporção de túbulos com lume formado e aumento de túbulos sem lume quando comparados com o grupo Controle 15dias (Figura 1).

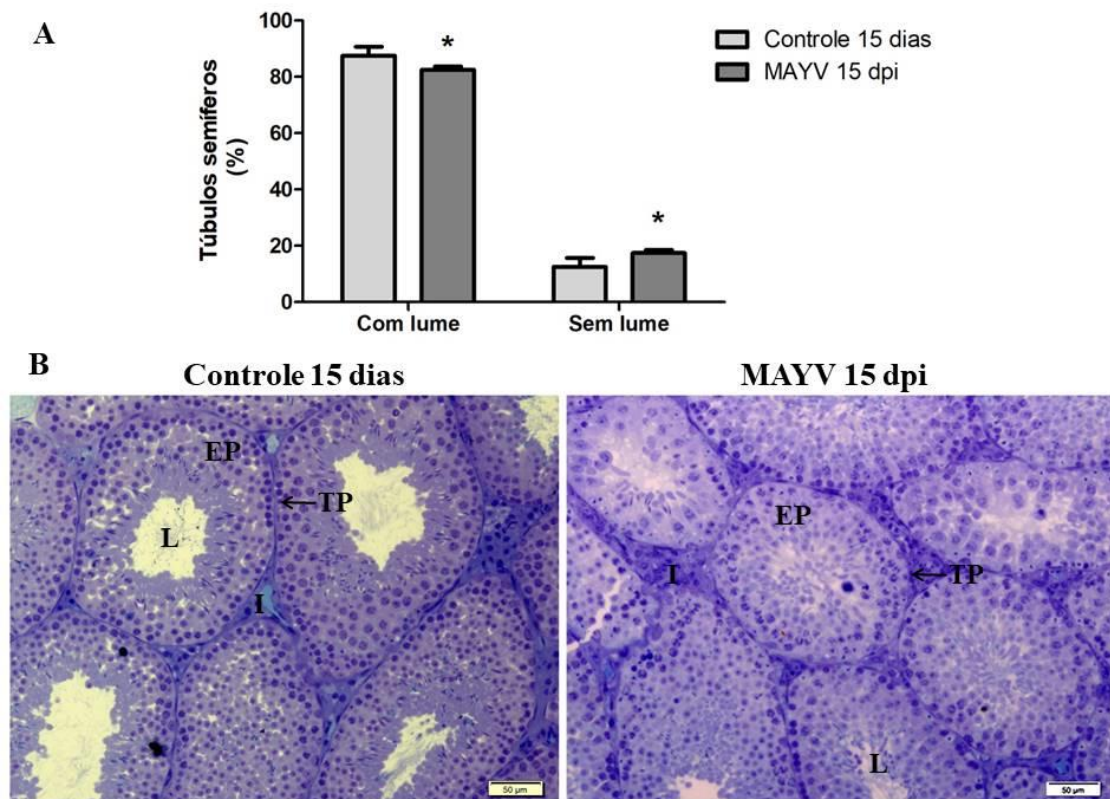


Figura 1: Proporção de túbulos seminíferos em formação (A) Proporção de túbulos seminíferos em formação de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV), 15 dias pós infecção.. * entre tratamentos indica que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t. (B) Fotomicrografias dos túbulos seminíferos dos grupos controle e tratado. L- Lume; Ep- Epiélio seminífero; I- Intertúbulo; TP- Túnica própria. Cortes de 3 μ m corados com Azul de toluidina. Barra: 50 μ m

Histomorfometria testicular

A microestrutura testicular pode ser observada na Figura 2. O grupo MAYV 15dpi teve aumento no percentual de túnica própria; os demais parâmetros não tiveram diferença significativa. Os animais analisados do grupo MAYV 45dpi apresentaram aumento no percentual de túnica própria e o percentual de lume diminuiu (Tabela 2).

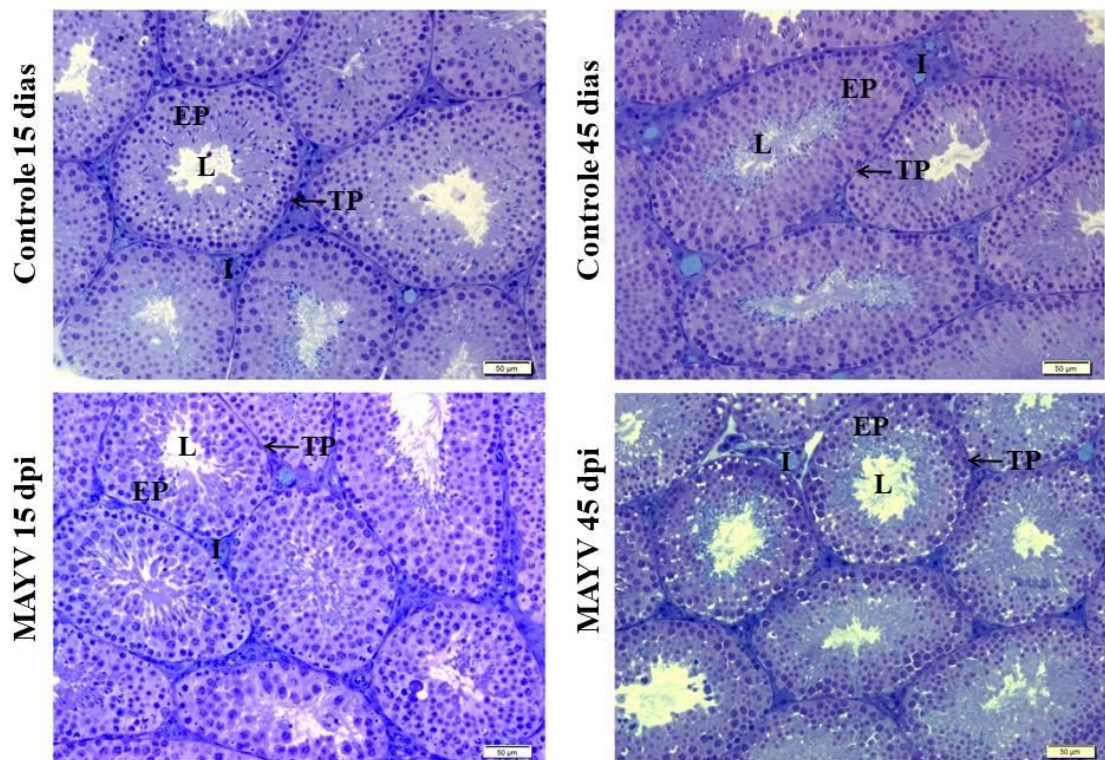


Figura 2: Fotomicrografia do parênquima testicular dos grupos Controles 15 e 45 dias, MAYV 15 e 45 dpi (dias pós infecção com Mayaro vírus - MAYV). L- Lume; Ep- Epitélio seminífero; I- Intertúbulo; TP- Túnica própria. Corte de 3 µm corados com Azul de toluidina. Barra: 50µm

Tabela 2. Proporção dos componentes tubulares e índices tubulossomático e epiteliossomático, de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

	Controle 15 dias	MAYV 15dpi	Controle 45 dias	MAYV 45dpi
T (%)	90,61±0,55	92,03±1,92	91,50±1,20	91,92±0,79
E (%)	68,36±2,74	69,40±2,08 ^a	71,61±1,75	71,35±0,83
TP (%)	9,73±1,06	11,35±0,66 *	9,05±0,46	11,02±0,97 *
L (%)	12,52±1,43 ^a	11,28±1,05	10,83±0,57	9,55±0,61 *

T- percentual de Túbulo seminífero; E - percentual de epitélio seminífero; TP – Percentual de Túnica Própria; L- Percentual de Lume; dpi – dias pós infecção. Dados expressos como média±DP. * entre tratamento e controle, indicam que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

Houve aumento de CTT por grama de testículo no grupo MAYV 15dpi. O grupo MAYV 45dpi também apresentou aumento de CTT por grama de testículo e CTT por testículo (Tabela 3).

Tabela 3. Morfometria de túbulo seminífero de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

	Controle 15 dias	MAYV 15dpi	Controle 45 dias	MAYV 45dpi
DT (μm)	177,12 \pm 12,56	169,42 \pm 3,64	185,14 \pm 14,85	175,73 \pm 15,37
AE(μm)	56,52 \pm 3,21	55,88 \pm 3,05	59,24 \pm 2,41	56,34 \pm 2,07
DL(μm)	64,08 \pm 6,80	57,66 \pm 2,61	66,66 \pm 7,17	63,06 \pm 11,70
CTT/t (m)	2,99 \pm 1,47	2,09 \pm 0,51	4,76 \pm 1,23	6,15 \pm 0,45 *
CTT/gT (m/g)	21,59 \pm 10,52	33,52 \pm 3,55*	26,63 \pm 4,13	36,72 \pm 8,14 *
ART ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$)	24725,98 \pm 3494,32	22539,50 \pm 963,80	26982,94 \pm 3075,56	24457,79 \pm 5103,70
ARL ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$)	3252,14 \pm 705,82	2614,06 \pm 241,34	3520,08 \pm 731,78	3207,35 \pm 1183,28
ARE ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$)	21473,84 \pm 2830,30	19925,44 \pm 1035,04	23462,86 \pm 2446,95	21250,43 \pm 3953,42
RTE †	1,15 \pm 0,01	1,13 \pm 0,01	1,15 \pm 0,02	1,15 \pm 0,03

DT – Diâmetro de túbulo; AE- altura do Epitélio; DL- Diâmetro de Lume; CTT/t- Comprimento total de túbulo seminífero; CTT/g- Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo; ART – área do túbulo; ARL – área do lume; ARE – área do epitélio; RTE – Relação túbulo/Epitélio; dpi – dias pós-infecção. Dados expressos como média \pm DP. * entre tratamentos e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

Contagem das células no estágio 1

O grupo MAYV 45dpi apresentou aumento no índice mitótico e no rendimento geral da espermatogênese. Não houve diferenças significativas nos demais parâmetros (Tabela 4).

Tabela 4. Número corrigido de células no estágio I do ciclo do epitélio seminífero, razões entre os tipos celulares, número de células de Sertoli e produção espermática diária, de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

	Controle 45 dias	MAYV 45dpi
Espermatogônia	2,14±0,30	1,82±0,42
Preleptóteno/ Leptóteno	23,14±1,90	25,39±4,43
Paquíteno	26,33±3,27	29,95±4,94
Espermátide Arredondada	62,14±6,56	66,95±13,88
Sertoli	5,22±0,39	5,07±0,25
Índice mitótico	10,92±1,47	14,10±1,07*
Índice meiótico	2,37±0,13	2,23±0,13
Índice de cél. de Sertoli	11,92±1,43	13,13±2,10
SER /t	4,97±0,67	4,62±0,56
SER/gt	30,09±0,68	27,37±5,61
Capacidade Suporte de Sertoli	21,82±2,45	24,36±3,52
Rendimento Geral da Espermatogênese	31,23±3,80	36,91±2,81*
PDE/t	3,22x10 ⁶ ±4,80x10 ⁵	3,30x10 ⁶ ±1,23x10 ⁶ *
PDE/gt	2,33x10 ⁷ ±3,03x10 ⁶	1,97x10 ⁷ ±8,42x10 ⁶ ^a

SER/t – Número de célula de Sertoli por testículo; SER/gt – Número de célula de Sertoli por grama e testículo; PDE/t – Produção espermática diária por testículo; PDE/gt – Produção espermática diária por grama de testículo; dpi – dias pós-infecção.. Dados expressos como média±DP. * entre tratamentos e controle indica valores que diferem significativamente entre si (p≤0,05). ANOVA e Teste t.

Histopatologia testicular

O grupo MAYV 45dpi apresentou queda na proporção de túbulos seminíferos normais e aumento de patologias leve e moderada (Figura 3).

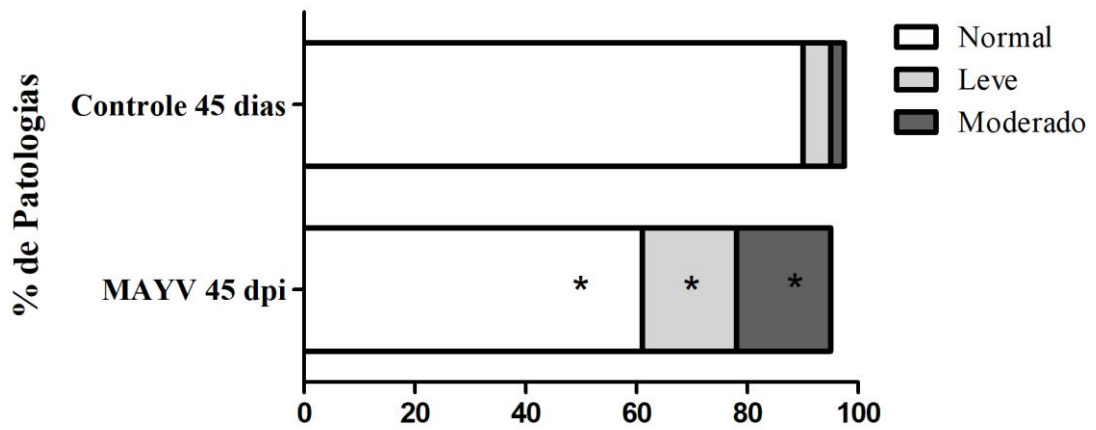


Figura 3: Proporção de túbulos seminíferos patológicos de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV), 45 dias pós infecção.

Viabilidade das Células Germinativas

A porcentagem de células germinativas viáveis diminuiu no grupo MAYV 15dpi. No entanto, o grupo MAYV 45dpi não apresentou diferença significativa (Figura 4).

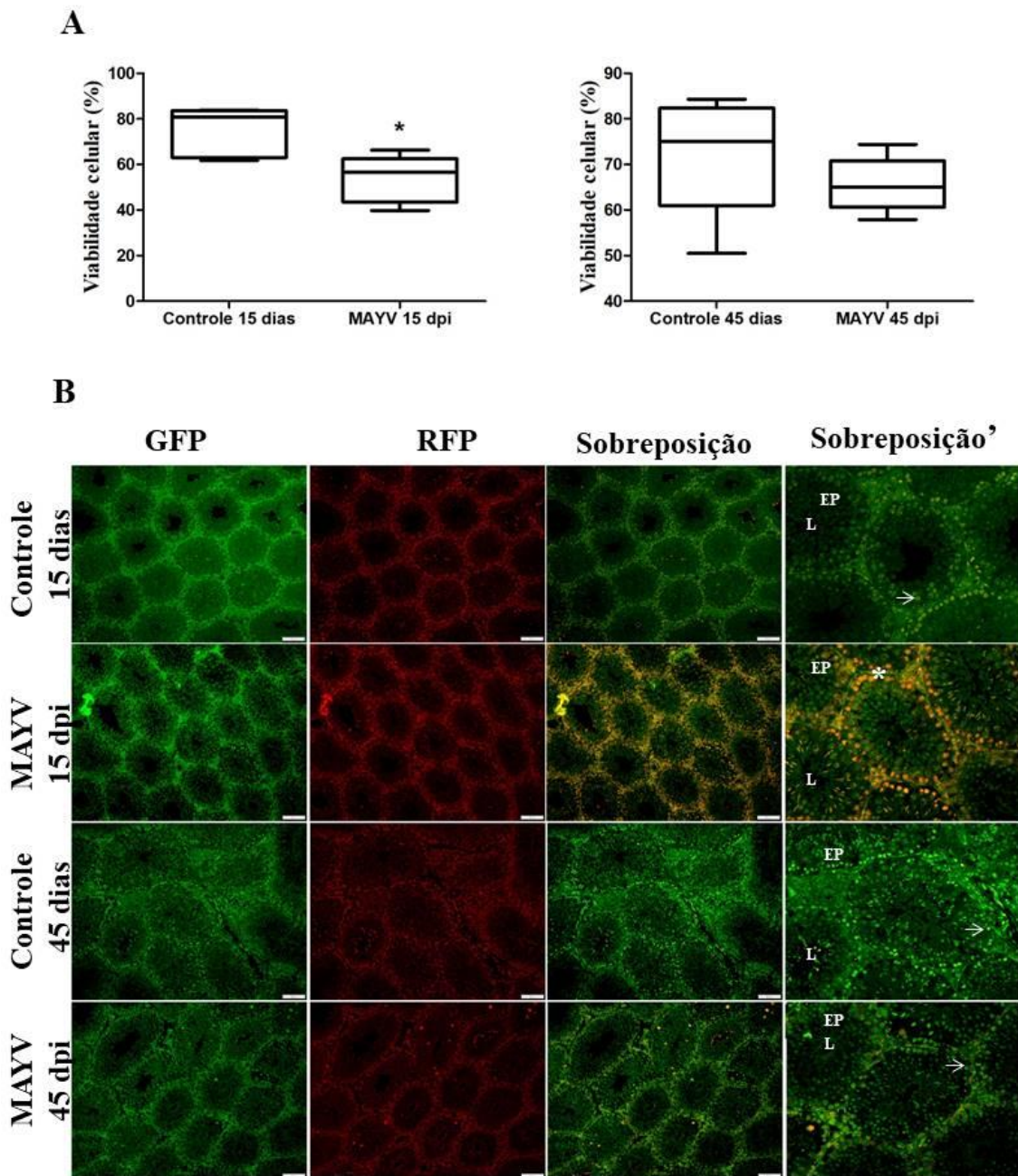


Figura 4: (A) Proporção de células germinativas viáveis no testículo de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV) 15 e 45 dias pós infecção. Dados expressos como média±DP. * entre tratamento e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste t.; (B) Cortes histológicos de 1 μm de espessura do testículo dos grupos controles e tratado. GFP – imagens visualizadas no filtro 488 nm; RFP – imagens visualizadas no filtro 580 nm; Sobreposição - imagens de sobreposição dos filtros; Sobreposição' - imagens de sobreposição ampliadas. Ep - epitélio; L – lúmen; \rightarrow - Núcleos verdes - células viáveis; * -Núcleos amarelos - processo de morte celular precoce. Barra: 50 μm .

Histomorfometria Intertubular

A microestrutura e composição do intertúbulo podem ser observadas na Figura 5. Houve queda nas proporções de vasos sanguíneos, núcleo de Leydig, citoplasma de Leydig, células de Leydig e conjuntivo no grupo MAYV 15dpi. Apenas o percentual de citoplasma de Leydig e células de Leydig mantiveram em queda no grupo MAYV 45dpi (Tabela 5).

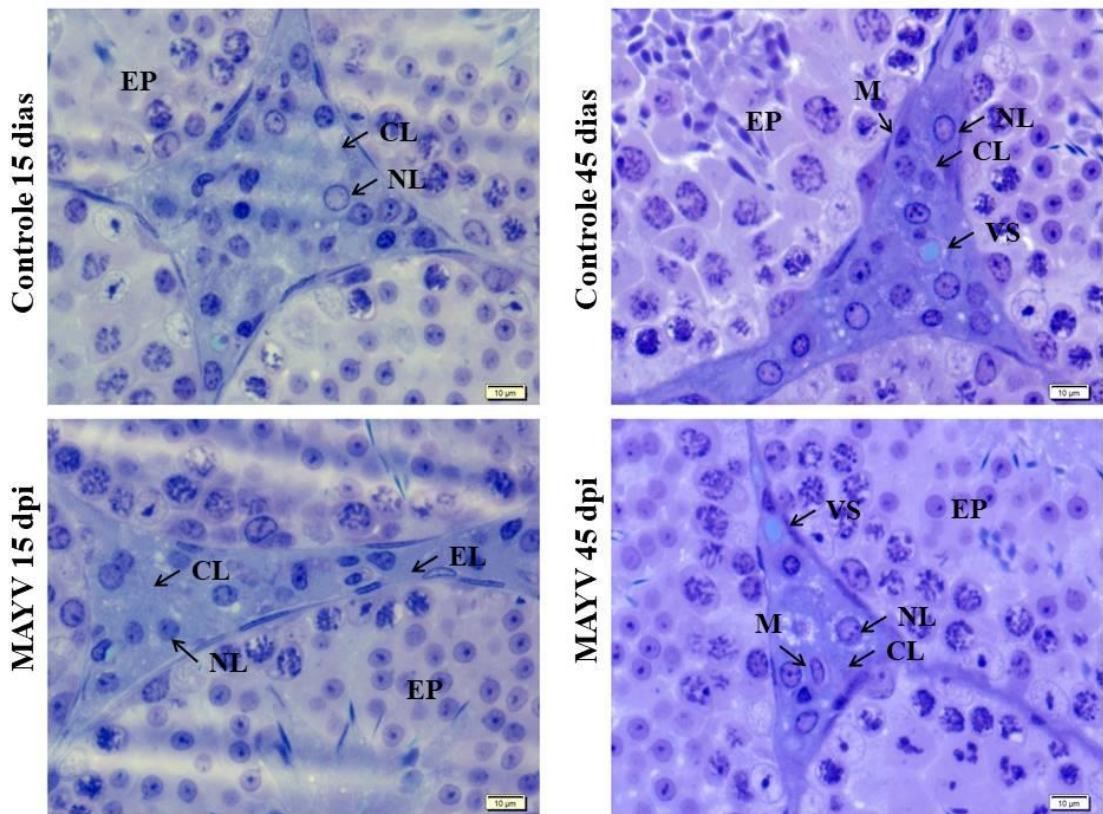


Figura 5: Fotomicrografias da estrutura e composição intertubular dos grupos Controles 15 e 45 dias, MAYV 15 e 45 dpi (dias pós infecção com Mayaro vírus - MAYV). NL- Núcleo de Célula de Leydig; CL- Citoplasma de célula de Leydig; VS- Vaso sanguíneo; EP-Epitélio seminífero; M- macrófago. Cortes de 3 µm corados com Azul de toluidina. Barra: 10µm

Tabela 5. Proporção dos componentes do intertúbulo testicular de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

	Controle 15 dias	MAYV 15dpi	Controle 45 dias	MAYV 45dpi
Intertúbulo (%)	9,43±0,53	8,08±1,82	8,58±1,19	7,78±0,45
Vaso sanguíneo (%)	0,51±0,11	0,24±0,08 ^b	0,24±0,08	0,30±0,06
Espaço Linfático (%)	0,69±0,21	0,69±0,54	0,65±0,56	0,69±0,36
Núcleo de Leydig (%)	1,19±0,09	0,90±0,13 [*]	0,98±0,09	0,88±0,16
Citoplasma de Leydig (%)	6,29±0,38	5,02±0,95 [*]	6,00±0,74	5,01±0,28 [*]
Célula de Leydig (%)	7,48±0,44	5,91±1,08 [*]	6,98±0,79	5,89±0,40 [*]
Conjuntivo (%)	0,52±0,11	1,08±0,24 [*]	0,55±0,19	0,76±0,15
Macrófago (%)	0,16±0,03	0,16±0,15	0,16±0,05	0,15±0,04

Dados expressos como média±DP. * entre tratamentos e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

Nos parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig, o grupo MAYV 15dpi apresentou redução do diâmetro nuclear, do volume do núcleo, volume de Leydig por testículo, número de células de Leydig por testículo e índice Leydigossomático. Por outro lado, o grupo MAYV 45dpi apresentou aumento no índice Leydigossomático (Tabela 6)

Tabela 6: Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

Célula de Leydig	Controle 15 dias	MAYV 15dpi	Controle 45 dias	MAYV 45dpi
Diâmetro Nuclear (μm^3)	4,11±0,19	3,83±0,16*	4,38±0,14	4,18±0,15
Volume do Núcleo (μm^3)	36,50±5,22	29,61±3,62*	44,18±4,39	38,22±4,09
Volume do citoplasma (μm^3)	194,19±35,75	164,56±15,56	270,41±35,46	221,09±37,71
Volume da célula (μm^3)	230,63±40,89	194,16±18,60	314,59±38,31	259,30±40,35
Volume / t ($\times 10^6$)	0,01±0,002	0,003±0,001*	0,01±0,002	0,01±0,003
Volume / gt ($\times 10^6$)	0,05±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	0,06±0,004
Número / t ($\times 10^6$)	$3,31 \times 10^7 \pm 9,81 \times 10^6$	$1,56 \times 10^7 \pm 4,32 \times 10^6$ *	$3,06 \times 10^7 \pm 6,47 \times 10^7$	$3,77 \times 10^7 \pm 9,92 \times 10^6$
Número / gt ($\times 10^6$)	$2,37 \times 10^8 \pm 5,60 \times 10^7$	$2,51 \times 10^8 \pm 5,54 \times 10^7$	$1,73 \times 10^8 \pm 2,57 \times 10^7$	$2,19 \times 10^8 \pm 4,53 \times 10^7$
Índice Leydigossomático (%)	0,03±0,01	0,02±0,005*	0,03±0,01	0,04±0,01*

Dados expressos como média±DP. * entre tratamentos e controle, diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

Contagem espermática no testículo e epidídimo

O grupo MAYV 45dpi apresentou número reduzido de espermátide por testículo e por grama de testículo, e queda na produção espermática diária por testículo e por grama de testículo. Na região da cabeça e do corpo do epidídimo houve queda do número de espermatozoides por órgão e por grama do órgão no grupo MAYV 45dpi, sendo que na região da cauda também foi observado número reduzido de espermatozoides por grama de órgão (Tabela 7).

Tabela 7: Parâmetros de contagem espermática no testículo e epidídimo de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

	Controle 45 dias	MAYV 45dpi
Número de espermátide /t	3,96±0,42	1,38±0,35 *
Número de espermátide /gt	59,96±11,69	22,51±6,26 *
PED/t	0,82±0,09	0,28±0,07 *
PED /gt	10,70±1,70	2,86±0,41 *
Número de espermatozoide CC/Org	2,05±0,61	0,65±0,27 *
Número de espermatozoide CC/gOrg	90,83±29,46	28,13±13,13 *
Tempo de trânsito CC (Dias)	2,51±0,64	2,24±0,49
Número de espermatozoide C/Org	1,30±0,77	0,99±0,42
Número de espermatozoide na C/gOrg	110,82±30,46	61,92±20,23
Tempo de trânsito C (dias)	1,50±0,85	3,51±1,42

PED: produção espermática diária. CC: cabeça e corpo do epidídimo. C:Cauda do epidídimo: dpi – dias pós infecção. Dados expressos como média±DP. * entre tratamentos e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

Motilidade e integridade de membrana do espermatozoide

O grupo MAYV 45dpi apresentou queda na motilidade espermática, bem como redução na porcentagem de espermatozoides com membrana celular intacta (Figura 6).

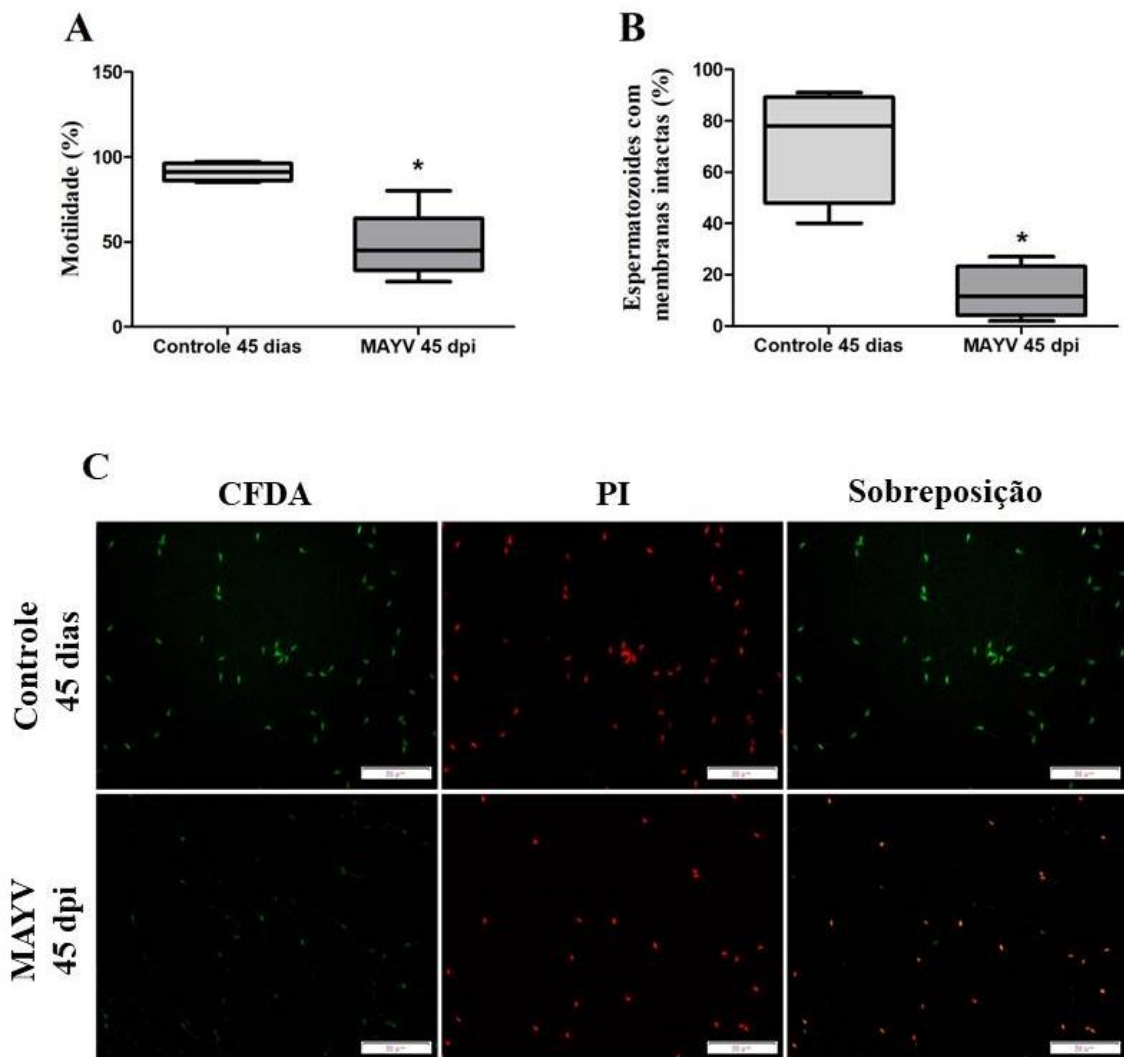


Figura 6: (A) Motilidade espermática e (B) integridade de membrana espermática, de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV), analisados 45 dias pós infecção; (C) Imagens dos espermatozoides dos grupos controle e tratado. Membrana acrossômica marcada com diacetato de carboxifluoresceína (CFDA, Verde); cabeça do espermatozoide não intacto marcada com iodeto de propídio (PI, Vermelho); Sobreposição - imagens de sobreposição. Barra= 20 μ m.

Estresse Oxidativo do testículo e epidídimo

No testículo, o grupo MAYV 15dpi apresentou redução de atividade da CAT e aumento de atividade da GST, além da redução dos níveis de NO e MDA. No epidídimo, apenas os níveis de NO foram reduzidos (Figura 7).

O grupo MAYV 45dpi, na porção testicular, apresentou queda na atividade das enzimas SOD, CAT e aumento de atividade da GST, além da redução dos níveis de NO e MDA. Na porção epididimária, houve redução de atividade da enzima GST e dos níveis de NO e MDA (Figura 8).

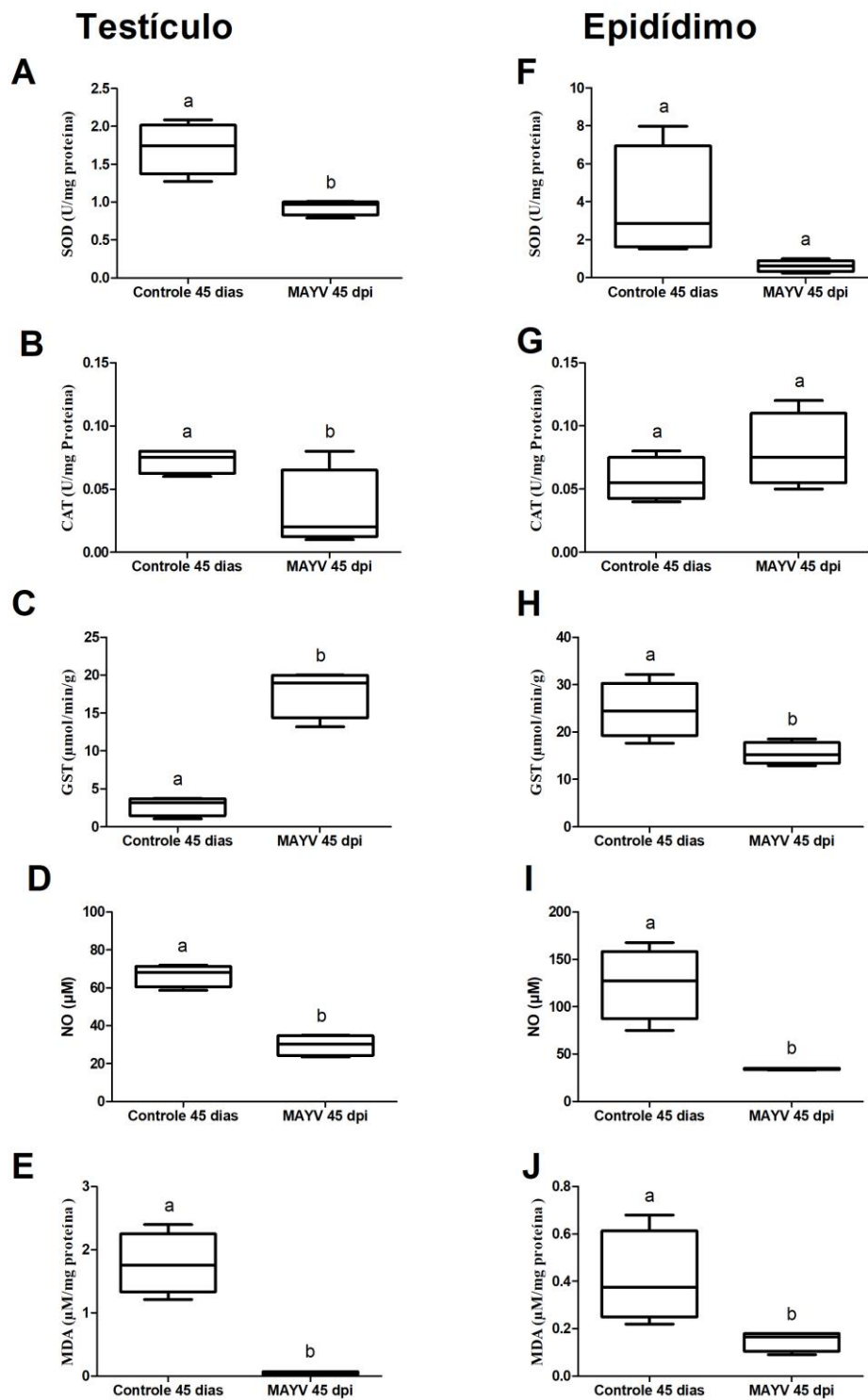


Figura 8: Avaliação do estresse oxidativo e nitrosativo no testículo e epidídimo de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV), analisados 45 dias pós infecção. Atividade das enzimas antioxidantes: A e F - Superóxido dismutase (SOD); B e G - Catalase (CAT); C e H - Glutationa (GTS). Concentrações de óxido nítrico (ON) – D e I, e de malondialdeído (MDA) – E e J. * entre tratamento e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Test t.

Determinação da capacidade antioxidante total (FRAP)

Não foi observado diferença significativa da capacidade antioxidante total do soro nos grupos MAYV 15dpi e 45dpi (Figura 9).

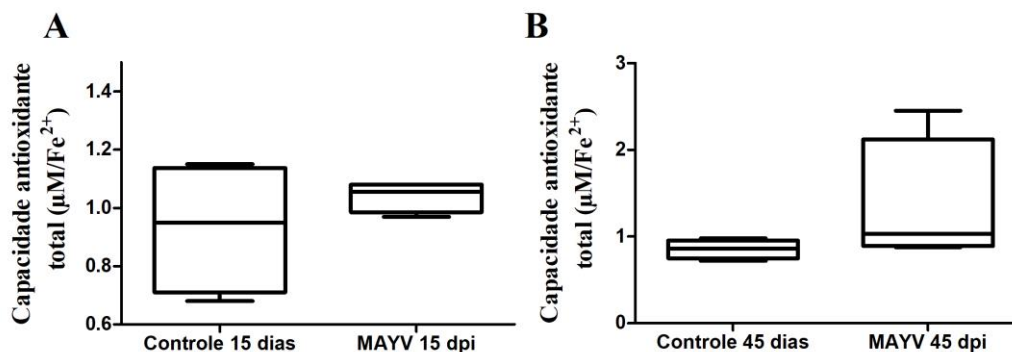


Figura 8: Capacidade antioxidante total do soro de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV), analisados 15 e 45 dias pós infecção. * entre tratamento e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Test t.

DISCUSSÃO

Estudos sobre o MAYV ainda são escassos e se limitam aos dados clínicos e aos efeitos resultando em artralgias (Azevedo et al., 2009; Halsey et al., 2013). Aqui descrevemos pela primeira vez os efeitos da infecção causada pelo MAYV no sistema reprodutor masculino com foco na produção, armazenamento e qualidade espermática.

A febre do Mayaro é responsável por causar sintomas como a tríade de febre abrupta, cefaleia, mialgia, vômitos, diarreia, dentre outros sintomas (Acosta-Ampudia et al., 2018). Esses sintomas tornam os indivíduos debilitados e podem acarretar perda de peso, assim como observado nos camundongos do presente trabalho, nos tempos de 15 e 45 dias pós-infecção (dpi). A perda de peso corporal também foi observada em animais com 15 dias de idade e infectados com MAYV (Santos et al., 2019). O grupo 15dpi apresentou redução no peso testicular e por consequência, redução no peso da albugínea e do parênquima testicular, sugerindo que esta redução possa ter acompanhado a perda de peso corporal sofrida. O IGS reduziu, o que implica em menor percentual de testículos no corpo. Os animais 45dpi apresentaram melhora no peso testicular, e aumento no IGS, o que pode ser devido ao estágio de desenvolvimento gonadal, onde ocorrem diversas mudanças morfológicas (Picut et al., 2018).

O desenvolvimento do sistema reprodutor masculino de camundongos é semelhante ao de ratos, sendo dividido em período pós-natal (7 dias), período infantil (8 a 20 dias), período juvenil (21 a 32 dias) e período peripuberal (33 a 60 dias) (Picut & Remick, 2016). Os animais foram infectados no período infantil, onde ocorre rápida proliferação de espermatogônias e células de Sertoli sendo que, ao final deste período são formados a barreira hematotesticular e o lume tubular (Picut et al., 2018). A eutanásia do grupo MAYV 15dpi ocorreu já no período juvenil, que é caracterizado pelo início do processo espermatogênico (Picut et al., 2018) e de acordo com o resultado da proporção de túbulos seminíferos em formação, houve um atraso no desenvolvimento deste grupo, pois foi maior a proporção de túbulos ainda com lumes não formados.

Embora o grupo MAYV 15dpi tenha apresentado atraso no desenvolvimento testicular, os dados da proporção dos componentes tubulares mostraram apenas aumento na porcentagem de túnica própria, sendo mais visível alterações no grupo MAYV 45dpi, onde o aumento da túnica própria persistiu e a porcentagem de lume diminuiu. O aumento da túnica própria pode estar relacionado ao aumento da produção de fibras colágenas (Bhide et al., 2005) e este aumento refletiu na queda de percentual do lume, uma vez que o percentual de epitélio se manteve. Apesar do diâmetro tubular não ter alterado significativamente, a redução no seu valor refletiu no aumento do comprimento de túbulo por grama de testículo nos grupos MAYV 15dpi e 45dpi e aumento de comprimento de túbulo por testículo no grupo MAYV 45dpi, como forma de compensação.

Durante o período peripuberal ocorre a diferenciação e o aumento dos túbulos seminíferos e, com a conclusão da sua diferenciação, as espermatídes alongadas já podem ser vistas dando início à maturidade sexual (Picut et al., 2018). De acordo com a contagem das células germinativas no estágio I é possível calcular o rendimento espermático. Apesar de não haver diferença significativa na quantidade de espermatogônias e espermatócitos em preleptóteno, o aumento numérico dessas células refletiu no aumento do índice mitótico no grupo MAYV 45dpi. O rendimento geral da espermatogênese também foi maior, provavelmente devido ao aumento numérico das espermatídes arredondadas.

Fatores externos podem ser prejudiciais na microarquitetura testicular trazendo danos à espermatogênese, como a presença de vacúolos situado entre as células germinativas, causando deslocamento e desordem no epitélio germinativo. Pode ocorrer também a perda da aderência dos espermatócitos com a célula de Sertoli ou perda da barreira hematotesticular, resultando na descamação do epitélio seminífero para o lume do túbulo (Lanning et al., 2002).

Animais do grupo 45dpi apresentaram menor porcentagem de túbulos normais e aumento de histopatologias leves e moderadas. Pela viabilidade celular, animais com 15dpi tiveram a viabilidade afetada, com danos iniciais ao DNA. O grupo 45dpi não teve a viabilidade celular comprometida, mostrando que quanto mais próximo do período de viremia, maior é o dano causado e por se tratar de um período de alta atividade celular, a proliferação das células germinativas, o tecido testicular conseguiu reverter esse processo.

O MAYV utiliza os glóbulos brancos para replicar e tem como principal alvo os macrófagos. Outros arbovírus da mesma família como CHIKV (Chikungunya), RRV (Ross River) e SINV (Sindbis) também têm o envolvimento dos macrófagos na replicação viral, estando entre os principais tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório dos tecidos lesados pela infecção (Way et al., 2002; Labadie et al., 2010; Kumar et al., 2012; De Castro-Jorge et al., 2019; Diagne et al., 2020). Os macrófagos testiculares compartilham digitações intracitoplasmáticas únicas conectadas fisicamente com as células de Leydig, que são formadas entre 20 e 30 dias de idade (Hutson, 1992). Juntos contribuem para a manutenção da fertilidade, regulando o nicho imunoprivilegiado para a espermatogênese por meio da via de regulação dos macrófagos testiculares, e a redução dessas células traz consequência negativa para o desenvolvimento testicular (Gaytan et al., 1994; Heinrich & DeFalco, 2020). Como consequência da perturbação causada pelo vírus no intertúbulo, foi observado reduções nos seus componentes e de células de Leydig no grupo 15 dpi. Neste período de desenvolvimento já é esperado encontrar escassez de células intersticiais (Picut & Remick, 2016), porém neste grupo, a redução foi ainda maior, sendo que a redução do citoplasma de Leydig e célula de Leydig persistiu no grupo 45dpi.

As células de Leydig são responsáveis pela produção da testosterona, e o processo inflamatório viral pode modificar todo o seu funcionamento (Govero et al., 2016). O grupo 15dpi teve o diâmetro nuclear da célula de Leydig reduzido, assim como o volume e número de células por testículo, o que provavelmente comprometeu a síntese de testosterona, pois a produção está relacionada não apenas com a capacidade esteroidogênica da célula de Leydig, mas também com o número de células de Leydig por testículo (Yao et al., 2019).

A fim de verificar se a fertilidade dos animais infectados ficou comprometida, a contagem espermática se torna um importante marcador da fertilidade masculina (Silva et al., 2020). Como reflexo da perturbação do ambiente imunoprivilegiado da espermatogênese, e a possível escassez de testosterona produzida, o número de espermátides por testículo e por grama de testículo reduziu no grupo 45dpi, assim como a produção espermática por testículo e

por grama de testículo. As espermátides são responsáveis pela qualidade dos espermatozoides, pois a partir do processo de diferenciação celular, eles serão formados passando por alterações morfológicas até alcançar sua forma final (Russel et al., 1990). As espécies reativas de oxigênio (EROs) no testículo podem causar danos aos espermatozoides, pois interferem na compactação da cromatina, aumentando a sensibilidade das células ao estresse oxidativo, resultando na fragmentação do DNA (Kodama et al., 1997).

A produção excessiva de EROs pode ter influenciado negativamente no número e na qualidade dos espermatozoides existentes no lume do epidídimo, visto que, houve redução de espermatozoides nas regiões da cabeça, corpo e cauda, além da redução da motilidade espermática e integridade de membrana dos espermatozoides. Essas alterações também podem ser explicadas pelo quadro de estresse oxidativo que ocorreu devido a injúria celular no período de infecção com a produção excessiva de EROs, gerando um desequilíbrio entre os agentes antioxidantes e oxidantes (Valko et al., 2007; Ivanov et al., 2017).

O estresse oxidativo não danifica apenas as células somáticas, mas também os espermatozoides, reduzindo a motilidade e causando danos ao DNA, membranas e proteínas (Aitken et al., 1998; Wu et al., 2020). Quando o quadro de estresse oxidativo acontece, a superóxido dismutase (SOD), que representa o primeiro sistema enzimático antioxidante responsável por catalisar o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Barreiros et al., 2006). O grupo 15dpi, na porção testicular, não teve alteração na concentração desta enzima, mas ativou o segundo sistema enzimático, a catalase (CAT), que é responsável por decompor o H_2O_2 em uma molécula de água e uma de oxigênio (Barreiros et al., 2006). A CAT diminuiu no grupo 15dpi, pois provavelmente chegou à exaustão, ativando então o terceiro sistema enzimático da glutathione S-transferase (GST). A GST aumentou neste grupo, pois é responsável por reduzir a produção da peroxidação lipídica pela redução dos hidroperóxidos, sendo responsável pela desintoxicação celular (Hayes et al., 2005). O malondialdeído (MDA) produzido pela peroxidação lipídica é um importante sinalizador de estresse oxidativo (Janero, 1990) e, neste grupo, o MDA não alterou, indicando que o estresse oxidativo não ocorreu e as enzimas conseguiram reverter o processo devolvendo equilíbrio ao organismo.

O NO, um importante marcador para o estresse nitrosativo, diminuiu no testículo e epidídimo em todos os tempos pós-infecção. Em condições normais ele atua como regulador necessário para resposta imune e mediador funcional. O efeito causado pelo NO depende da

sua concentração e, estando em níveis reduzidos, possui a função protetora (Dusse et al., 2003; Yoshioka et al., 2003; Pierini & Bryan, 2015).

Na porção testicular do grupo 45dpi, houve ativação do primeiro sistema enzimático antioxidante, a SOD diminuiu chegando à exaustão, ativando então a CAT e GST. Ambas tiveram seus níveis elevados, sendo efetivas no processo antioxidante, pois os níveis de MDA não foram alterados. Na porção epididimária do grupo 45dpi, a GST foi ativada e chegou à exaustão, podendo ser considerada efetiva, pois os níveis de MDA não foram alterados. Embora fosse esperado que no epidídimo o aumento de expressão de enzimas antioxidantes reduzisse os danos causados pelas EROs nos espermatozoides (Wu et al., 2020), tal melhora não ocorreu nos animais desse grupo. O estresse oxidativo ocorreu de modo local, uma vez que o FRAP no soro não foi alterado em qualquer dos tempos pós-infecção, pois ele é um indicativo da quantidade total de antioxidante não enzimático presente (Samudi et al., 2009)

Como a infecção afetou o testículo e o epidídimo, a baixa qualidade e produção espermática podem estar relacionadas aos altos níveis de EROs produzidos, o que prejudica a maturação dos espermatozoides no epidídimo (Wu et al., 2020). Além disso, o MAYV mostrou ter interferência direta no compartimento intertubular, sendo as células de Leydig as mais afetadas, o que pode ter perturbado a produção da testosterona, prejudicando assim a espermatogênese e a qualidade espermática.

CONCLUSÕES

Concluimos que o MAYV é capaz de atrasar o desenvolvimento testicular, causar histopatologias de níveis leve e moderado, reduzir a viabilidade celular e os parâmetros da célula de Leydig. Também interfere no processo espermatogênico com alterações na quantidade, qualidade e a motilidade espermática.

REFERÊNCIAS

- Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J. M., & Ramírez-Santana, C. (2018). Mayaro: an emerging viral threat? *Emerging Microbes and Infections*, 7(1).
- Aitken, R. J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennings, Z., & Irvine, D. S. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 59(5), 1037–1046.
- Auguste, A. J., Liria, J., Forrester, N. L., Giambalvo, D., Moncada, M., Long, K. C., Morón, D., de Manzione, N., Tesh, R. B., Halsey, E. S., Kochel, T. J., Hernandez, R., Navarro, J. C., & Weaver, S. C. (2015). Evolutionary and ecological characterization of mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1742–1750.
- Azevedo, R. S. S., Silva, E. V. P., Carvalho, V. L., Rodrigues, S. G., Nunes Neto, J. P., Monteiro, H. A. O., Peixoto, V. S., Chiang, J. O., Nunes, M. R. T., & Vasconcelos, P. F. C. (2009). Mayaro fever virus, Brazilian amazon. *Emerging Infectious Diseases*, 15(11), 1830–1832.
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. (2006). Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quimica Nova*, 29(1), 113–123
- Benzie, IFF. , Strain, JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “ Antioxidant Power ” : the FRAP assay , *Anal Biochem*. 239, 70 –76.
- Bhide, V. M., Laschinger, C. A., Arora, P. D., Lee, W., Hakkinen, L., Larjava, H., Sodek, J., & McCulloch, C. A. (2005). Collagen phagocytosis by fibroblasts is regulated by decorin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 23103–23113.
- Bo, D., Jiang, X., Liu, G., Xu, F., Hu, R., Wassie, T., Chong, Y., Ahmed, S., Liu, C., & Girmay, S. (2020). Multipathway synergy promotes testicular transition from growth to spermatogenesis in early-puberty goats. *BMC Genomics*, 21(1), 1–16.
- Cleton, N., Koopmans, M., Reimerink, J., Godeke, G. J., & Reusken, C. (2012). Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of Clinical Virology*, 55(3), 191–203.
- De Castro-Jorge, L. A., De Carvalho, R. V. H., Klein, T. M., Hiroki, C. H., Lopes, A. H., Guimarães, R. M., Fumagalli, M. J., Floriano, V. G., Agostinho, M. R., Silhessarenko, R. D., Ramalho, F. S., Cunha, T. M., Cunha, F. Q., Da Fonseca, B. A. L., & Zamboni, D. S.

- (2019). The NLRP3 inflammasome is involved with the pathogenesis of Mayaro virus. *PLoS Pathogens*, *15*(9), 1–27.
- Diagne, C. T., Bengue, M., Choumet, V., Hamel, R., Pompon, J., & Missé, D. (2020). Mayaro virus pathogenesis and transmission mechanisms. *Pathogens*, *9*(9), 1–23.
- Dusse, L. M., Vieira, L. M., & Carvalho, M. das G. (2003). Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, *39*(4), 343–350.
- E Silva, P. V., Borges, C. dos S., Rosa, J. de L., Pacheco, T. L., Figueiredo, T. M., Leite, G. A. A., Guerra, M. T., Anselmo-Franci, J. A., Klinefelter, G. R., & Kempinas, W. D. G. (2020). Effects of isolated or combined exposure to sibutramine and rosuvastatin on reproductive parameters of adult male rats. *Journal of Applied Toxicology*, *40*(7), 947–964.
- Fijak, M., Pilatz, A., Hedger, M. P., Nicolas, N., Bhushan, S., Michel, V., Tung, K. S. K., Schuppe, H. C., & Meinhardt, A. (2018). Infectious, inflammatory and “autoimmune” male factor infertility: How do rodent models inform clinical practice? *Human Reproduction Update*, *24*(4), 416–441.
- Gaytan, F., Bellido, C., Morales, C., Reymundo, C., Aguilar, E., & Van Rooijen, N. (1994). Selective depletion of testicular macrophages and prevention of Leydig cell repopulation after treatment with ethylene dimethane sulfonate in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, *101*(1), 175–182.
- Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S. M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D. J., Gorman, M. J., Richner, J. M., Caine, E. A., Salazar, V., Moley, K. H., & Diamond, M. S. (2016). Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*, *540*(7633), 438–442.
- Halsey, E. S., Siles, C., Guevara, C., Vilcarromero, S., Jhonston, E. J., Ramal, C., Aguilar, P. V., & Ampuero, J. S. (2013). Mayaro virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010–2013. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(11), 1839–1842.
- Han, S. W., Jung, Y. K., Lee, E. J., Park, H. R., Kim, G. W., Jeong, J. H., Han, M. S., & Choi, J. Y. (2013). DICAM inhibits angiogenesis via suppression of AKT and p38 MAP kinase signalling. *Cardiovascular Research*, *98*(1), 73–82.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *45*, 51–88.
- Heinrich, A., & DeFalco, T. (2020). Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology*, *8*(4), 903–914.
- Hutson, J. C. (1992). Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and

- testicular macrophages of the rat. *Cell and Tissue Research*, 267(2), 385–389.
- Ivanov, A. V., Bartosch, B., & Isagulians, M. G. (2017). Oxidative stress in infection and consequent disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 10–13.
- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 515–540.
- Jung, Y. K., Jin, J. S., Jeong, J. H., Kim, H. N., Park, N. R., & Choi, J. Y. (2008). DICAM, a novel dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule interacts with $\alpha v \beta 3$ integrin. *Journal of Cellular Physiology*, 216(3), 603–614.
- Kodama, H., Kasai, H., Yamaguchi, R., Tanaka, T., & Fukuda, J. (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility*, 68(3), 519–524.
- Kumar, S., Jaffar-Bandjee, M. C., Giry, C., Connen De Kerillis, L., Merits, A., Gasque, P., & Hoarau, J. J. (2012). Mouse macrophage innate immune response to chikungunya virus infection. *Virology Journal*, 9, 1–8.
- Labadie, K., Larcher, T., Joubert, C., Mannioui, A., Delache, B., Brochard, P., Guigand, L., Dubreil, L., Lebon, P., Verrier, B., De Lamballerie, X., Suhrbier, A., Cherel, Y., Grand, R. Le, & Roques, P. (2010). Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 120(3), 894–906.
- Lanning, L. L., Creasy, D. M., Chapin, R. E., Mann, P. C., Barlow, N. J., Regan, K. S., & Goodman, D. G. (2002). Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30(4), 507–520.
- Liu, W., Han, R., Wu, H., & Han, D. (2018). Viral threat to male fertility. *Andrologia*, 50(11), 1–9. <https://doi.org/10.1111/and.13140>
- Lopes, N., Nozawa, C., & Linhares, R. E. C. (2014). Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 5(3), 55–64.
- Lv, Y., Fang, Y., Chen, P., Duan, Y., Huang, T., Ma, L., Xie, L., Chen, X., Chen, X., Gao, J., & Ge, R. S. (2019). Dicyclohexyl phthalate blocks Leydig cell regeneration in adult rat testis. *Toxicology*, 411(April 2018), 60–70.
- Mourão, M. P. G., Bastos, M. D. S., De Figueiredo, R. P., Gimague, J. B. L., Dos Santos Galusso, E., Kramer, V. M., De Oliveira, C. M. C., Naveca, F. G., & Figueiredo, L. T. M. (2012). Mayaro fever in the city of manaus, Brazil, 2007-2008. *Vector-Borne and*

- Zoonotic Diseases*, 12(1), 42–46.
- Picut, C. A., & Remick, A. K. (2016). Impact of Age on the Male Reproductive System from the Pathologist's Perspective. *Toxicologic Pathology*, 45(1), 195–205.
- Picut, C. A., Ziejewski, M. K., & Stanislaus, D. (2018). Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. *Birth Defects Research*, 110(3), 190–227. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1133>
- Pierini, D. ., & Bryan, N. S. (2015). Nitric Oxide Availability as a Marker of Oxidative Stress. *Advanced Protocols in Oxidative Stress III*, 1208, 1–477.
- Ribeiro-Filho, H. V., Coimbra, L. D., Cassago, A., Rocha, R. P. F., Guerra, J. V. da S., de Felicio, R., Carnieli, C. M., Leme, L., Padilha, A. C., Paes Leme, A. F., Trivella, D. B. B., Portugal, R. V., Lopes-de-Oliveira, P. S., & Marques, R. E. (2021). Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. *Nature Communications*, 12(1), 1–13.
- Russell LD., Ettlín RA., Sinha HAP., Clegg ED (1990). Histopathology of the testis. In Histological and histopathological evaluation of the testis .Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED, editors. p. 210–266. Florida.
- Samudi, C., Govind, S. K., Bustam, A. Z., & Kuppusamy, U. R. (2009). Attenuation of hydrogen peroxide and ferric reducing/antioxidant power serum levels in colorectal cancer patients with intestinal parasitic infection. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 16(2), 15–20.
- Santos, F. M., Dias, R. S., de Oliveira, M. D., Costa, I. C. T. A., Fernandes, L. de S., Pessoa, C. R., da Matta, S. L. P., Costa, V. V., Souza, D. G., da Silva, C. C., & de Paula, S. O. (2019). Animal model of arthritis and myositis induced by the mayaro virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), 1–20.
- Siu, M. K. Y., & Cheng, C. Y. (2004). Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis. *BioEssays*, 26(9), 978–992.
- SOUZA, A. F. P. D. V. B. DE. (2019). *Estudos genômicos, filogenéticos e proteômicos de alfavírus (CHIKV e MAYV)*. Universidade de Brasília.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Way, S. J. R., Lidbury, B. A., & Banyer, J. L. (2002). Persistent Ross River virus infection of murine macrophages: An in vitro model for the study of viral relapse and immune

- modulation during long-term infection. *Virology*, *301*(2), 281–292.
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, *85*(2), 328–345. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
- Wu, P. Y., Scarlata, E., & O’flaherty, C. (2020). Long-term adverse effects of oxidative stress on rat epididymis and spermatozoa. *Antioxidants*, *9*(2).
- Yoshioka, Y., Yamamuro, A., & Maeda, S. (2003). Nitric oxide at a low concentration protects murine macrophage RAW264 cells against nitric oxide-induced death via cGMP signaling pathway. *British Journal of Pharmacology*, *139*(1), 28–34.
- Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., Nair, S., Basore, K., Klimstra, W. B., Rimkunas, R., Fong, R. H., Lin, H., Poddar, S., Crowe, J. E., Doranz, B. J., Fremont, D. H., & Diamond, M. S. (2018). Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*, *557*(7706), 570–574.

CAPÍTULO 2:

Infecção por ZIKV em camundongos Balb/c imaturos provoca atraso no desenvolvimento tubular com quadro de estresse oxidativo alterando a produção e os parâmetros espermáticos

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) é um *Flavivirus* de RNA fita simples e envelopado, os sinais clínicos são geralmente febre baixa, artralgia, mialgia, cefaleia, dor abdominal, dor retro-orbitária, erupções cutâneas e conjuntivite. O ZIKV está presente no sêmen, havendo relatos documentados da transmissão sexual de homem para mulher, homem para homem e menos frequente de mulher para homem (Musso et al., 2019). Neste estudo buscamos avaliar as implicações causadas pelo ZIKV em animais imaturos e os efeitos em diferentes tempos pós-infecção até chegar à vida adulta, com foco na espermatogênese, no armazenamento e na qualidade espermática. Foram divididos em quatro grupos experimentais (n=8/grupo), sendo os grupos Controle e o Grupo ZIKV 15dpi, e os grupos Controle e Grupo ZIKV 45dpi. Os pesos corporal, testicular e do parênquima foram reduzidos, e o desenvolvimento tubular apresentou atraso. Houve aumento nos percentuais de túbulo e epitélio seminíferos, túnica própria e na relação túbulo/epitélio. Redução no percentual de lume, diâmetro de túbulo, altura de epitélio, diâmetro de lume, bem como as áreas de túbulo, lume e epitélio. A porcentagem de túbulos normais foi reduzida e a histopatologia de nível moderado aumentou, e houve redução de células viáveis. No intertúbulo a porcentagem de espaço linfático aumentou, como consequência, a porcentagem do citoplasma de Leydig e da própria célula de Leydig foi reduzida. Os volumes de citoplasma de Leydig, célula de Leydig, célula de Leydig por testículo e por grama de testículo foram reduzidos; apenas o número de células de Leydig por grama de testículo aumentou. O número de espermatozoides na cabeça, corpo e cauda do epidídimo foi reduzido, e o tempo de trânsito na região da cabeça e corpo diminuiu. A motilidade espermática e integridade de membrana dos espermatozoides reduziram. Houve elevação nos níveis das enzimas antioxidantes SOD e MDA no testículo e epidídimo, e redução nos níveis de NO no testículo. Concluimos que o ZIKV teve forte interferência na microarquitetura testicular afetando a fertilidade, que ficou comprometida devido à baixa qualidade dos espermatozoides.

INTRODUÇÃO

O Zika vírus (ZIKV) é um *Flavivírus* de RNA fita simples e envelopado. Embora o primeiro isolamento do ZIKV tenha sido em 1947, a primeira doença causada em humanos associada com o vírus foi na Nigéria em 1953, confirmada pela infecção de três pessoas (Dick G, 1952; MacNamara, 1954; Prasad et al., 2017). Os sinais clínicos são geralmente febre baixa, artralgia, mialgia, cefaleia, dor abdominal, dor retro-orbitária, erupções cutâneas e conjuntivite (Marano et al., 2016). A transmissão pode ser por meio da picada do mosquito *Aedes aegypti*, por transfusão, vertical (de mãe para filho) ou sexual (Masmajan et al., 2020). Pelo ambiente imunoprivilegiado que os testículos possuem, faz com que o ZIKV persista caso haja a entrada no túbulo seminífero, estabelecendo um reservatório viral, o que constitui um problema de saúde pública (Govero et al., 2016; Ma et al., 2016; Musso et al., 2015).

O ambiente imunoprivilegiado do testículo é protegido pela barreira hematotesticular da célula de Sertoli e o ZIKV é capaz de permanecer no sistema reprodutor masculino, trazendo consequências para a espermatogênese (Masmajan et al., 2020). As células de Sertoli suportam bem a replicação pelo ZIKV e a sua fisiologia é consideravelmente modificada, pois ela possui o receptor da família Axl TAM (Tyro3, Axl e Mer), que o ZIKV utiliza para infectar e assim obter acesso ao ambiente do epitélio seminífero. Além disso, a infecção pode acarretar a morte celular das espermatogônias, trazendo consequências para a espermatogênese (Lemke & Rothlin, 2008; Kumar et al., 2018; Masmajan et al., 2020). No intertúbulo, as células de Leydig são menos suscetíveis a infecção por ZIKV, mas os níveis de testosterona durante a infecção são consideravelmente alterados, enquanto os macrófagos infectados promovem o aumento de mediadores inflamatórios responsáveis pelo comprometimento da integridade da barreira hematotesticular (Govero et al., 2016; Siemann et al., 2017).

O ZIKV está presente no sêmen, havendo relatos documentados da transmissão sexual de homem para mulher, homem para homem e menos frequente de mulher para homem (Musso et al., 2019). Desse modo, deve ser criada uma alerta a respeito da fertilidade masculina, pois o ZIKV altera a qualidade espermática e reduz o número de espermatozoides móveis em 50%, surgindo tais efeitos entre os 7 dias pós-infecção (dpi) e 60 dpi (Joguet et al., 2017).

Os estudos, em sua maioria, estão relacionados a animais púberes/adultos e suas implicações no sistema reprodutor masculino (Govero et al., 2016; Ma et al., 2016; Duggal et al., 2017). Neste estudo buscamos avaliar as implicações causadas pelo ZIKV em animais

imaturos e os efeitos em diferentes tempos pós-infecção até chegar à vida adulta, com foco na espermatogênese e nas células envolvidas, no armazenamento e na qualidade espermática.

MATERIAL E MÉTODOS

Estoque e título viral

A cepa do vírus Zika (ZIKV PE243) foi propagada utilizando-se células vero, cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) em garrafas de 75 cm² a 28°C. O título viral foi determinado pelo método TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose) em placas de 96 poços, sendo mantidas a 37°C e 5% CO₂ até atingirem cerca de 80% de confluência. O título viral foi expresso em Unidades Formadoras de Placa por mililitro (PFU/mL).

Grupos experimentais

O experimento seguiu as normas determinadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (protocolo 70/2019). Trinta e dois camundongos machos Balb/c (22 g; 15 dias de idade) foram divididos em quatro grupos experimentais (n=8/grupo), sendo os grupos de 15 dias: o Controle 15 dias e o Grupo ZIKV 15dpi (dias pós-infecção), e os grupos de 45 dias: o Controle 45 dias e o Grupo ZIKV 45dpi. Os animais de cada grupo foram alojados em gaiolas coletivas e eutanasiados com 30 e 60 dias de idade.

Os animais foram infectados por inoculação intraperitoneal e receberam 200µl de ZIKV na concentração de 1x10⁴ PFU.

Coleta do material biológico

Os animais foram pesados (balança de precisão 0,01g, AS500, Marte) e anestesiados com tiopental (i.p., 30mg/kg) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue coletado foi centrifugado e congelado (-80 °C). Os testículos foram dissecados e pesados, para análises histológicas seis testículos do lado direito foram fixados em Karnovsky (glutaraldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4). Para a análise de estresse oxidativo, seis testículos do lado esquerdo foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a (-80°C). Quatro testículos e epidídimos foram congelados a -20°C para a análise de trânsito espermático e cinco epidídimos para a motilidade e integridade de membrana do espermatozoide.

Microscopia de luz

Para a microscopia de luz, os fragmentos do testículo foram desidratados em concentrações crescentes de etanol em 70%, 80%, 90% e 100%, e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica). No micrótomo rotativo RM 2255, Leica, foram feitos cortes de 3µm de espessura, com intervalo de 39 µm entre os cortes. Para a coloração foi utilizado azul de toluidina (borato de sódio 1%). As imagens digitais obtidas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX -53, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan). Para a morfometria, utilizou-se o software Image J (National Institute of Health, USA).

Biometria corporal e testicular

O testículo fixado foi pesado, a albugínea retirada e pesada. Pelo peso corporal e testicular foi calculado então o índice gonadossomático (IGS), que representa o percentual de peso corporal alocado em gônadas, a partir da fórmula:

$$\text{IGS (\%)} = \frac{\text{Peso total das gônadas}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

Com o peso do parênquima testicular (peso testicular – peso da albugínea) e do peso corporal foi calculado o índice parenquimossomático (IPS) através da equação:

$$\text{IPS (\%)} = \frac{\text{Peso do parênquima dos dois testículos}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

Proporção de túbulos seminíferos em formação

Duzentos túbulos seminíferos em formação foram contabilizados nos animais dos grupos Controle 15 dias e ZIKV 15 dpi, sendo classificados com lume e sem lume.

Histomorfometria testicular

A proporção volumétrica dos componentes dos túbulos seminíferos foi calculada a partir de uma grade com 266 intercessões (pontos), em 10 campos aleatórios, totalizando 2660 pontos por animal. Foram contabilizados pontos sobre a túnica própria, epitélio seminífero, lúmen e intertúbulo. Para calcular a proporção volumétrica dos componentes testiculares foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Proporção volumétrica (\%)} = \frac{NT}{NTT} \times 100$$

Onde NT= Registro do número de pontos contados sobre o componente e NTT= Número de pontos totais contados.

O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado considerando o percentual ocupado por cada constituinte multiplicado pelo volume do parênquima testicular. Para o diâmetro tubular médio, foram medidos, aleatoriamente, 20 túbulos seminíferos que apresentavam forma mais circular possível. Para a altura do epitélio seminífero, a mensuração se deu pela distância da túnica própria até o lúmen, em duas medidas diametralmente opostas, utilizando-se as mesmas secções transversais usadas para medir o diâmetro tubular.

Para os cálculos das áreas tubular (ART), luminal (ARL) e epitelial (ARE) , em μm^2 , foram utilizadas as seguintes equações: $ART = \pi.RT^2$ (RT= raio tubular); $ARL = \pi.RL^2$ (RL= raio luminal); $ArE = ArT - ArLU$ e a Relação T/E= ArT/ArE . O comprimento total dos túbulos seminíferos, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal (Dorst & Sajonski, 1974). O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da fórmula: $CTT/g = \text{Comprimento total de túbulos} / \text{Peso bruto dos testículos (g)}$.

Contagem das células no estágio 1

As células germinativas tais como espermatogônias do tipo A (A), espermatócitos primários em preleptóteno / leptóteno (PL / L), espermatócitos primários em paquíteno (P), espermátides arredondadas (RS) e as células de Sertoli (S), foram quantificadas em secções transversais de 20 túbulos seminíferos no estágio I por animal. Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos das células germinativas e de 30 nucléolos das células de Sertoli. Os resultados foram corrigidos de acordo com as variações do tamanho das células e espessura do corte pela seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}}$$

DM= diâmetro nuclear (nucleolar) médio.

Para avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli, foram estimadas razões a partir dos números corrigidos das células germinativas e de Sertoli (Dias et

al., 2019). As seguintes razões foram utilizadas: coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL/L:SGA); rendimento geral da espermatogênese (EAR: SGA); índice meiótico (EAR:PAQ); índice de célula de Sertoli (EAR: SER); capacidade total de suporte da célula de Sertoli (SGA + PL/L + PAQ + EAR:SER).

O número de células de Sertoli foi estimado a partir do número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio I e do comprimento total de túbulos seminíferos segundo a fórmula:

$$NCS = \frac{CTS (\mu m) \times N^{\circ} \text{ corrigido de nucléolos de cel. de Sertoli por secção transversal}}{\text{Espessura do corte } (\mu m)}$$

CTS= Comprimento total de túbulos seminíferos (μm).

A partir desse cálculo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo. A produção espermática diária (PED) foi calculada segundo AMANN e ALMQUIST (1961), de acordo com a fórmula:

$PED = \text{Volume de túbulo seminífero } (\mu m^3) \times \text{Número corrigido de espermátides arredondadas} / \text{Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias)} \times \text{Área da secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 } (\mu m^2) \times \text{espessura do corte histológico } (\mu m)$.

Os valores por grama de testículo foram estimados dividindo a PDE pelo peso testicular.

Histopatologia testicular

Foram utilizados 200 túbulos seminíferos analisados aleatoriamente, por animal. As alterações patológicas existentes nos testículos foram classificadas utilizando-se o score descrito por Johnsen (1970), modificado para oito níveis (Dias et al., 2019): Nível 1- túbulos íntegros, com células germinativas dispostas no seu sítio de localização normal e poucos vacúolos; Nível 2- vacúolos na base do epitélio; Nível 3- vacúolos no ápice do epitélio; Nível 4- vacúolos na base e no ápice do epitélio; Nível 5- células germinativas no interior do lúmen e presença de células em processo de degeneração; Nível 6- epitélio apenas com células basais; Nível 7- epitélios apenas com células de Sertoli; Nível 8- túbulos seminíferos desprovidos de células de Sertoli ou germinativas. Os níveis foram agrupados como: normais

(nível 1), com patologias leves (níveis 2 e 3), com patologias moderadas (níveis 4 e 5) e com patologias severas (níveis 6, 7 e 8).

Viabilidade das Células Germinativas

Para análise da viabilidade das células germinativas, os cortes histológicos de 1 μm foram corados com laranja de acridina e iodeto de propídio. O laranja de acridina cora as células viáveis em verde, o iodeto de propídio cora as células cuja integridade de membrana foi perdida em vermelho, sendo essas células classificadas de acordo com a condensação e fragmentação do núcleo e com a integridade de membrana (Giri & Roy, 2016). Para classificar as células, os núcleos corados em verde são as células viáveis e os núcleos corados de amarelo a vermelho indicam processo de morte celular. As imagens foram feitas em fotomicroscópio de fluorescência EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canada) e analisadas utilizando-se o software Image-Pro Plus.

Contagem de células no testículo e epidídimo

Foram contados os espermatozoides das regiões cabeça/corpo (C/C) e cauda (C) do epidídimo e as espermátides presentes no testículo que se mostraram resistentes à homogeneização. Os testículos foram pesados, retirada a cápsula albugínea e homogeneizados em 5 mL de NaCl 0,9% (Triton X-100 a 0,05%) por 3 minutos. Posteriormente, foram diluídos 5 vezes (1:5) na mesma solução, transferidos para a câmara de Neubauer, e as espermátides resistentes foram contadas. Para o cálculo da produção espermática diária, o número de espermátides por testículo foi dividido por 4,84 (número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero de camundongos) (Robb et al., 1978; Fernandes et al., 2007). A cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram homogeneizados, sendo 200mg da cabeça/corpo e 100 mg da cauda em 1 ml de solução de NaCl a 0,9% (Triton X-100 a 0,05%) por 3 minutos. Em seguida, o homogenato da cabeça/corpo foi diluído 2 vezes (1:2), e o da cauda não passou por uma segunda diluição. Para o cálculo do tempo de trânsito em cada região epididimária em dias, o número total de espermatozoide de cada segmento foi dividido pela produção espermática diária (Robb et al., 1978; Fernandes et al., 2007).

Análise espermática

Para obtenção dos espermatozoides, a região da cauda do epidídimo foi seccionada em uma placa de Petri, utilizando uma lâmina inox, diluído em 500 µL de solução Tris-citrato-frutose a 37 °C. Em seguida, 10 µL foram usados para a avaliação da motilidade onde foi calculada a proporção entre espermatozoides imóveis ou móveis em três campos aleatórios.

Para análise de integridade de membrana 10 µL de amostra foram adicionados em uma solução de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI) (Harrison & Vickers, 1990). Os espermatozoides foram classificados por possuírem membrana íntegra (CFDA + / PI-) e membrana não íntegra (CFDA-; PI +). Para a contagem foram analisados 200 espermatozoides, em microscópio de epifluorescência (610 nm, Olympus AX70 TRF, Tóquio, Japão), em aumento de 400x.

Histomorfometria Intertubular

A proporção volumétrica dos elementos do intertúbulo foi estabelecida pela contagem de 1000 pontos por animal, em imagens digitais do intertúbulo obtidas dos preparados histológicos. Foi lançada sobre a imagem uma grade com 600 intercessões (pontos), e os pontos incidentes sobre os elementos do tecido conjuntivo, macrófagos, vasos linfáticos, vasos sanguíneos, núcleo e citoplasma de Leydig foram contabilizados. Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula: $\text{Proporção volumétrica (\%)} = (\% \text{ proporção volumétrica de intertúbulo} \times \% \text{ proporção volumétrica do componente no intertúbulo}) / 100$. O volume (mL) dos componentes do intertúbulo nos testículos foi calculado pela equação: $\text{Volume} = \% \text{ do elemento nos testículos} \times \text{PPT} / 100$, onde: PPT= peso do parênquima testicular.

Para o cálculo do diâmetro nuclear da célula de Leydig foram medidos 30 núcleos esféricos, com nucléolo e cromatina perinuclear bem definidos. Foram então calculados os volumes (μm^3) nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e de cada célula de Leydig (VL) através das seguintes equações: $\text{VNL} = 4/3 \pi R^3$, onde R= Raio nuclear; $\text{VCL} = \% \text{ de citoplasma} \times \text{VNL} / \% \text{ de núcleo}$, $\text{VCL} = \text{VNL} + \text{VCL}$.

O volume ocupado pelas células de Leydig por testículo (VLT) foi calculado pela seguinte equação: $\text{VLT} (\mu\text{L}) = \text{Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular} \times \text{Peso do parênquima testicular (PPT)} / 100$. O volume das células de Leydig por grama de testículo (VL/gT) foi obtido pela equação: $(\text{VL/gT}) = \text{volume ocupado pela célula de Leydig por testículo (VLT)} / \text{peso bruto dos testículos (PT)}$. Os números de células de

Leydig por testículo (NLT) e por grama de testículo (NLg/T) foram calculados pelas fórmulas: $NLT = VLT (\mu m^3) / VL(\mu m^3)$ e $NLg/T = NLT / PT$.

O índice Leydigossomático (ILS), que determina o percentual de massa corporal alocado em células de Leydig, foi calculado utilizando fórmula: $ILS = \text{volume que as células de Leydig ocupam nos testículos} / PC \times 100$, onde PC=peso corporal.

Estresse Oxidativo

Os testículos foram homogeneizados em uma solução tampão fosfato de potássio (pH 7.4), na concentração de 100mg/1000 μ L, e centrifugados a 13,8 G, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA), níveis de proteína total e de enzimas antioxidantes testiculares: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST). Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas em duplicata usando um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou um leitor ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A atividade de catalase (CAT) foi avaliada de acordo com o método descrito por Aebi (Aebi, 1984). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada nos sobrenadantes conforme o método descrito por Siddiqui et al. (2005) e da glutathione S-transferase (GST) pela formação conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig et al., 1974). Os níveis de malondialdeído (MDA), que é o produto da peroxidação lipídica, foram determinados utilizando-se a solução TBARS (ácido tricloroacético 15% / ácido tiobarbitúrico 0,375% / ácido clorídrico 0,25M). Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados de acordo com Gutteridge e Halliwell (1990). A concentração do óxido nítrico (NO) foi determinada indiretamente através do teor de nitrito/nitrato pela reação de Griess (Ricart-Jané et al., 2002). A proteína total foi mensurada utilizando albumina do soro bovino como curva padrão (Lowry et al., 1951), e utilizada para homogeneização dos dados de estresse oxidativo.

Determinação da capacidade antioxidante total (FRAP)

A capacidade antioxidante total foi estimada de acordo com a capacidade redutora férrica do plasma (FRAP) com o método descrito por Benzie & Strain (1996) usando TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil) -s-triazina) como substrato.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de ShapiroWilk, utilizando o software STATISTICA for WINDOWS 3.11 para o teste t. Sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média.

RESULTADOS

Biometria corporal e testicular

Observou-se perda nos pesos corporal, testicular e do parênquima testicular e redução no percentual do IPS no grupo ZIKV 15dpi. No grupo ZIKV 45dpi não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros biométricos, corporais e testiculares, de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

	Controle 15dias	ZIKV 15dpi	Controle 45dias	ZIKV 45dpi
PC (g)	27,30 \pm 1,38	16,07 \pm 1,16*	34,26 \pm 0,54	27,68 \pm 1,88
PT(g)	0,14 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01*	0,16 \pm 0,07	0,11 \pm 0,03
PA (g)	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,004	0,04 \pm 0,02	0,03 \pm 0,004
PP (g)	0,10 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01*	0,12 \pm 0,05	0,08 \pm 0,03
IGS (%)	0,51 \pm 0,08	0,45 \pm 0,08	0,47 \pm 0,19	0,38 \pm 0,08
IPS (%)	0,36 \pm 0,07	0,23 \pm 0,06*	0,31 \pm 0,14	0,29 \pm 0,10

PC – Peso corporal; PT – Peso testicular; PA – Peso da albugínea; PP – Peso do parênquima testicular; IGS – Índice gonadossomático; IPS – Índice parenquimossomático; dpi – dias pós infecção. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes, * tratamento e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

Proporção de túbulos seminíferos em formação

De acordo com a proporção de túbulos seminíferos em formação, o grupo ZIKV 15dpi, apresentou redução nos túbulos com lume formado e aumento dos túbulos sem formação luminal (Figura 1).

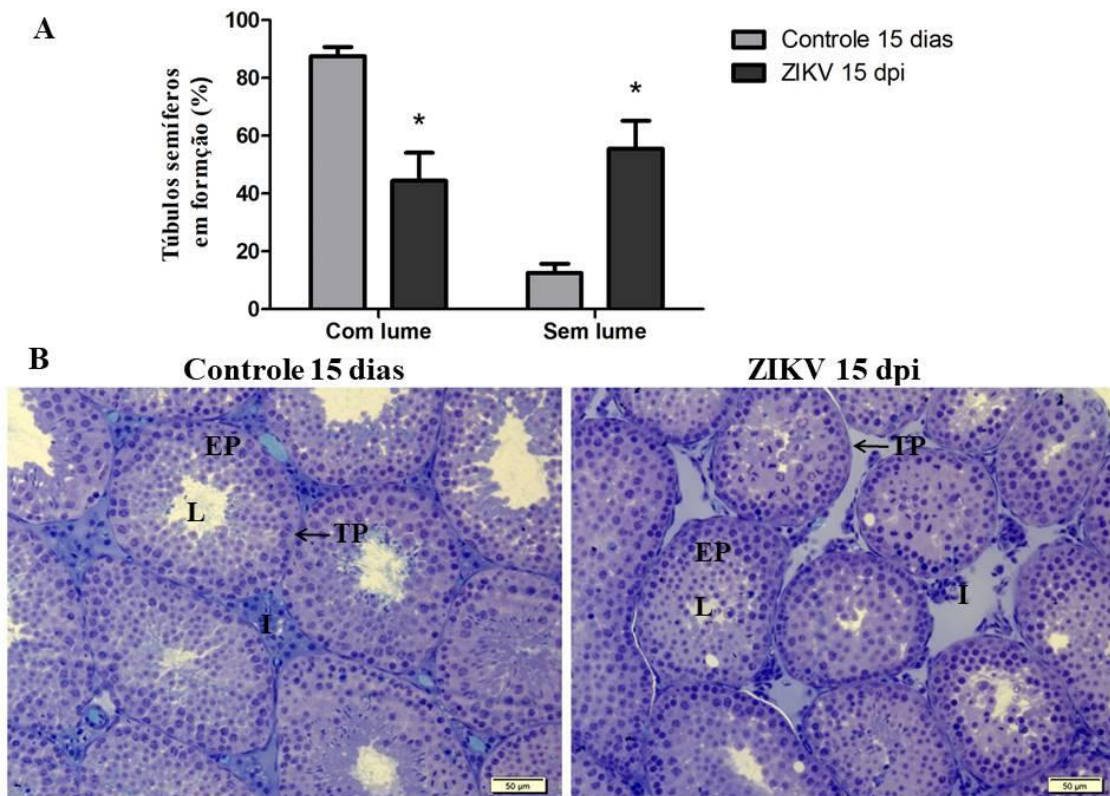


Figura 1: (A) Proporção de túbulos seminíferos em formação de camundongos Balb/c infectados com ZIKV, 15 dias pós-infecção (dpi). * entre tratamento e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste t. (B) Fotomicrografias dos túbulos seminíferos dos grupos controle e tratado. L- Lume; Ep- Epitélio seminífero; I- Intertúbulo; TP- Túnica própria. Cortes de 3 µm corados com Azul de toluidina. Barra: 50µm

Histomorfometria testicular

A microestrutura testicular pode ser observada na Figura 2. De acordo com os dados da histomorfometria testicular, o grupo ZIKV 15dpi apresentou aumento na proporção de túbulos seminíferos, epitélio seminífero e IES, e o percentual de lume reduziu. O grupo ZIKV 45dpi apresentou aumento da túnica própria apenas (Tabela 2).

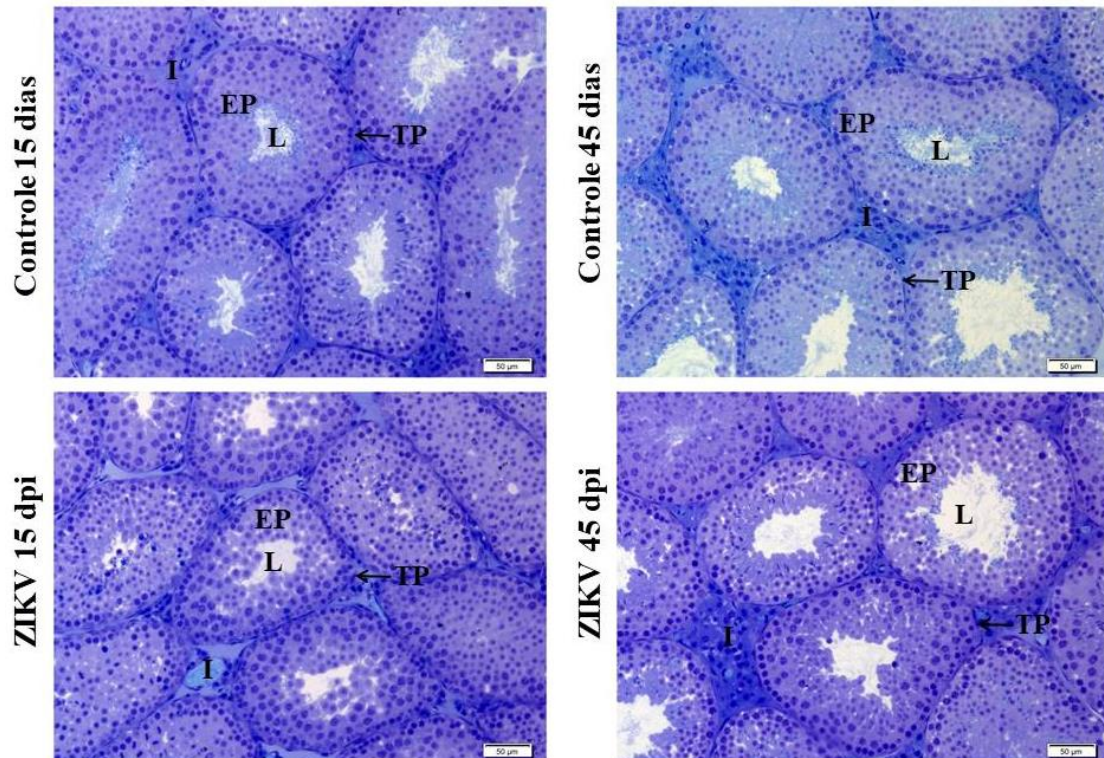


Figura 2: Fotomicrografias do parênquima testicular dos grupos Controles 15 e 45 dias, e tratados ZIKV 15 e 45 dpi (dias pós infecção). L- Lume; Ep- Epitélio seminífero; I- Intertúbulo; TP- Túnica própria. Cortes de 3 µm corados com Azul de toluidina. Barra: 50µm.

Tabela 2. Proporção dos componentes tubulares e índices tubulossomático e epiteliossomático, de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

	Controle 15 dias	ZIKV 15dpi	Controle 45 dias	ZIKV 45dpi
T (%)	90,62±0,49	91,52±0,73 *	91,48±1,08	91,21±0,97
E (%)	68,02±2,59	71,57±2,42 *	71,64±1,57	70,95±1,18
TP (%)	9,81±0,97	10,61±1,00	9,05±0,41	10,10±0,62 *
L (%)	12,80±1,45	9,34±1,39 *	10,79±0,52	10,16±0,78

T- percentual de Túbulo seminífero; E - percentual de epitélio seminífero; TP – Percentual de Túnica Própria; L- Percentual de Lume; Dpi – dias pós infecção. Dados expressos como média±DP. *entre tratamento e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste t.

Houve redução no diâmetro de túbulo e lume, na altura do epitélio seminífero, e nas áreas de túbulo, epitélio e lume no grupo ZIKV 15dpi. O grupo ZIKV 45dpi apresentou aumento na Relação túbulo/Epitélio apenas (Tabela 3).

Tabela 3. Morfometria de túbulo seminífero de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

	Controle 15 dias	ZIKV 15dpi	Controle 45 dias	ZIKV 45dpi
DT (µm)	177,10±11,23	148,33±4,80 *	184,04±12,31	177,52±7,52
AE (µm)	56,85±2,98	47,02±1,53 *	59,00±1,96	54,32±2,81
DL (µm)	63,41±6,30	54,29±3,76 *	66,03±6,60	68,89±3,44
CTT/t (m)	3,08±1,33	2,13±0,33	4,76±1,62	2,93±0,97
CTT/gT (m/g)	23,34±9,59	29,83±3,18	26,63±3,69	26,92±3,36
Área do túbulo (µm²x10⁴)	24704,93± 3125,84	17285,53± 1114,15 *	26655,36± 2865,51	24781,70± 2271,40
Área do lume (µm²x10⁴)	3182,53± 653,92	2323,26± 311,01 *	3451,24± 675,90	3733,57± 373,25
Área do epitélio (µm²x10⁴)	21522,40± 2534,29	14962,28± 868,45 *	23204,13± 2278,53	21048,13± 1984,49
RTE ‘	1,15±0,02	1,15±0,02	1,15±0,02	1,18±0,01 *

DT – Diâmetro de túbulo; AE- altura do Epitélio; DL- Diâmetro de Lume; CTT/t- Comprimento total de túbulo seminífero; CTT/g- Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo e RET – Relação túbulo/Epitélio; dpi- dias pós-infecção. Dados expressos como média±DP. * entre tratamentos indica que diferem significativamente entre si (p≤0,05). ANOVA e Teste t.

Contagem das células no estágio 1

De acordo com a contagem das células do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ZIKV 45dpi e Controle 45 dias (Tabela 4).

Tabela 4. Número corrigido de células no estágio I do ciclo do epitélio seminífero, razões entre os tipos celulares, número de células de Sertoli e produção espermática diária, de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

	Controle 45 dias	ZIKV 45dpi
Espermatogônia	2,14±0,30	2,30±0,36
Preleptóteno/ Leptóteno	23,14±1,90	21,69±1,73
Paquíteno	26,33±3,27	23,30±1,59
Espermátide Arredondada	62,14±6,56	52,78±4,36
Sertoli	5,22±0,39	4,62±0,72
Índice mitótico	10,92±1,47	9,65±1,83
Índice meiótico	2,37±0,13	2,27±0,10
Índice de cél. de Sertoli	11,92±1,43	11,52±1,09
SER /t	4,97±0,67	3,83±1,24
SER/gt	30,09±0,68	39,84±16,24
Capacidade Suporte de Sertoli	21,82±2,45	21,85±2,21
Rendimento Geral da Espermatogênese	29,23±3,80	23,51±4,80
PDE/t	3,22x10 ⁶ ±4,80x10 ⁵	3,08x10 ⁶ ±1,15x10 ⁶
PDE/gt	2,33x10 ⁷ ±3,03x10 ⁶	3,49x10 ⁷ ±2,65x10 ⁷

SER/t – Número de célula de Sertoli por testículo; SER/gt – Número de célula de Sertoli por grama e testículo; PDE/t – Produção espermática diária por testículo; PDE/gt – Produção espermática diária por grama de testículo; dpi – dias pós-infecção Dados expressos como média±DP. * entre tratamentos e controle, indicam que diferem significativamente entre si (p≤0,05). ANOVA e Teste t.

Histopatologia testicular

No grupo ZIKV 45dpi houve redução da proporção de túbulos seminíferos normais e aumento de histopatologia de nível moderado (Figura 3).

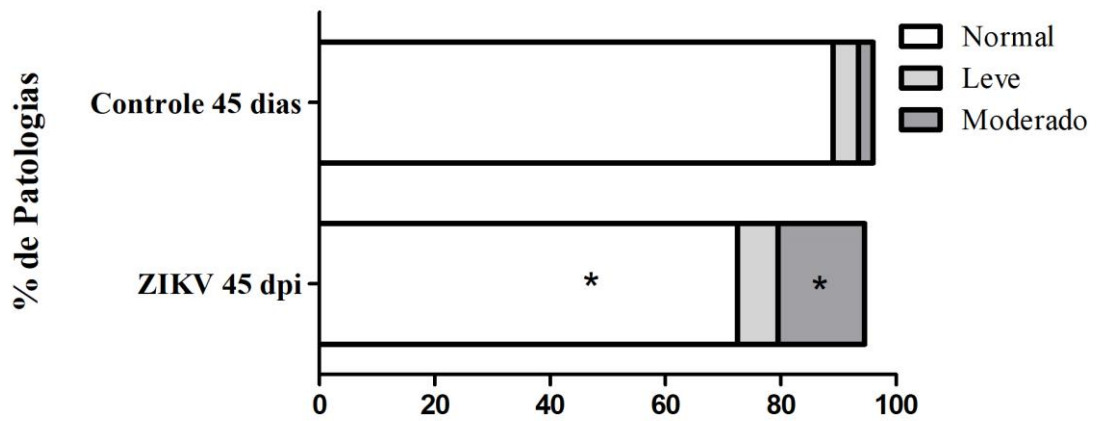


Figura 3: Proporção de túbulos seminíferos patológicos de camundongos Balb/c infectados com ZIKV. * entre tratamentos e controle indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

Viabilidade das Células Germinativas

Os grupos ZIKV 15dpi e ZIKV 45dpi apresentaram menor viabilidade celular quando comparado com os respectivos grupos controles (Figura 4).

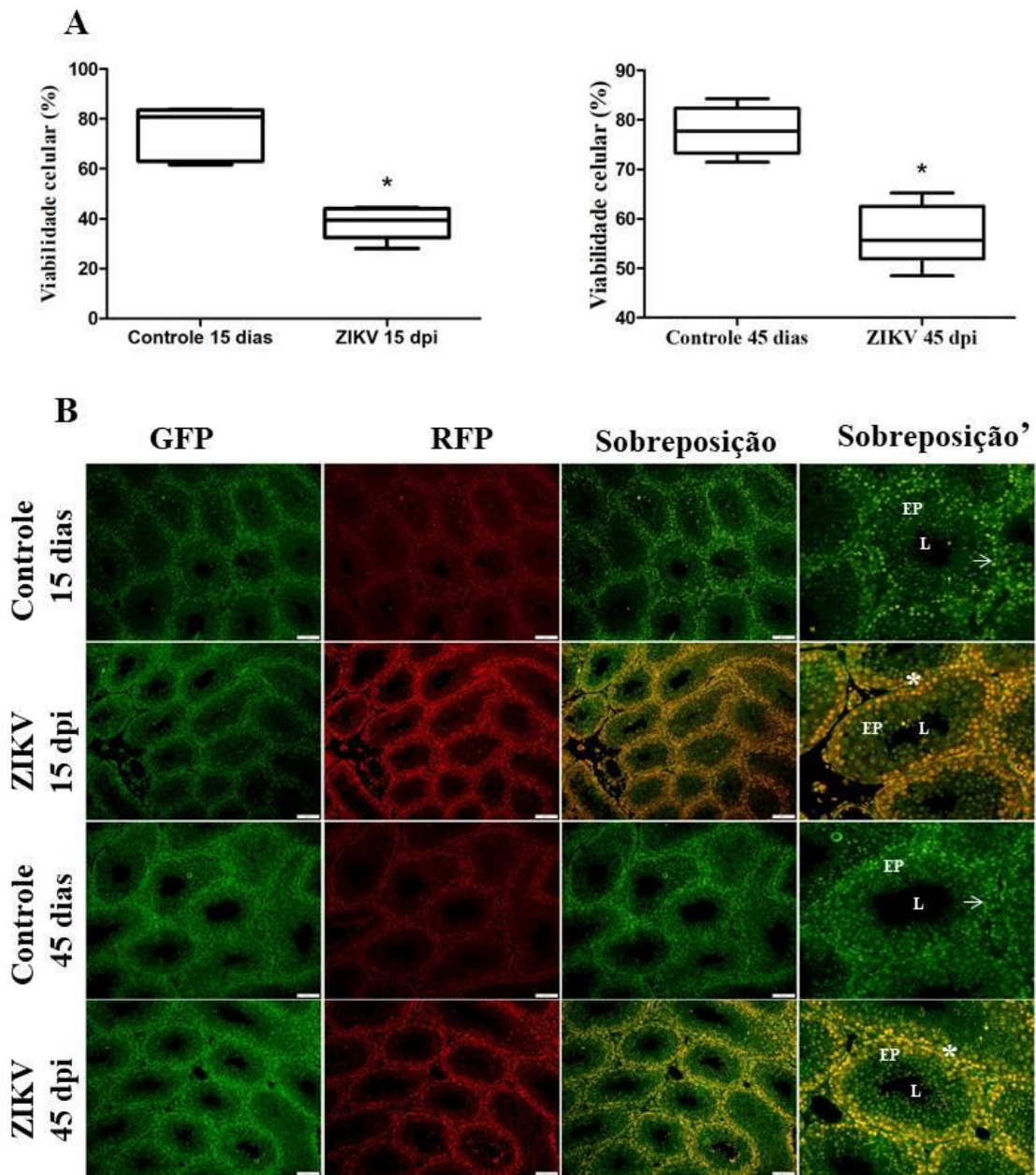


Figura 4: (A) Proporção de células germinativas viáveis no testículo de camundongos Balb/c infectados com ZIKV, 15 e 45 dias pós infecção. Dados expressos como média±DP., * entre tratamentos indica que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.; (B) Cortes histológicos de 1 μ m de espessura do testículo dos grupos controles e tratados. GFP – imagens visualizadas no filtro 488 nm; RFP – imagens visualizadas no filtro 580 nm; Sobreposição - imagens de sobreposição dos filtros; Sobreposição' - imagens de sobreposição ampliadas. Ep - epitélio; L – lúmen; → - Núcleos verdes - células viáveis; * -Núcleos amarelos - processo de morte celular precoce. Barra: 50 μ m.

Histomorfometria Intertubular

A microestrutura e composição do intertúbulo podem ser observadas na Figura 5. Observou-se no grupo ZIKV 15dpi aumento do percentual de espaço linfático e redução nos percentuais de citoplasma de Leydig e de células de Leydig. O grupo ZIKV 45dpi não apresentou diferenças significativas (Tabela 5).

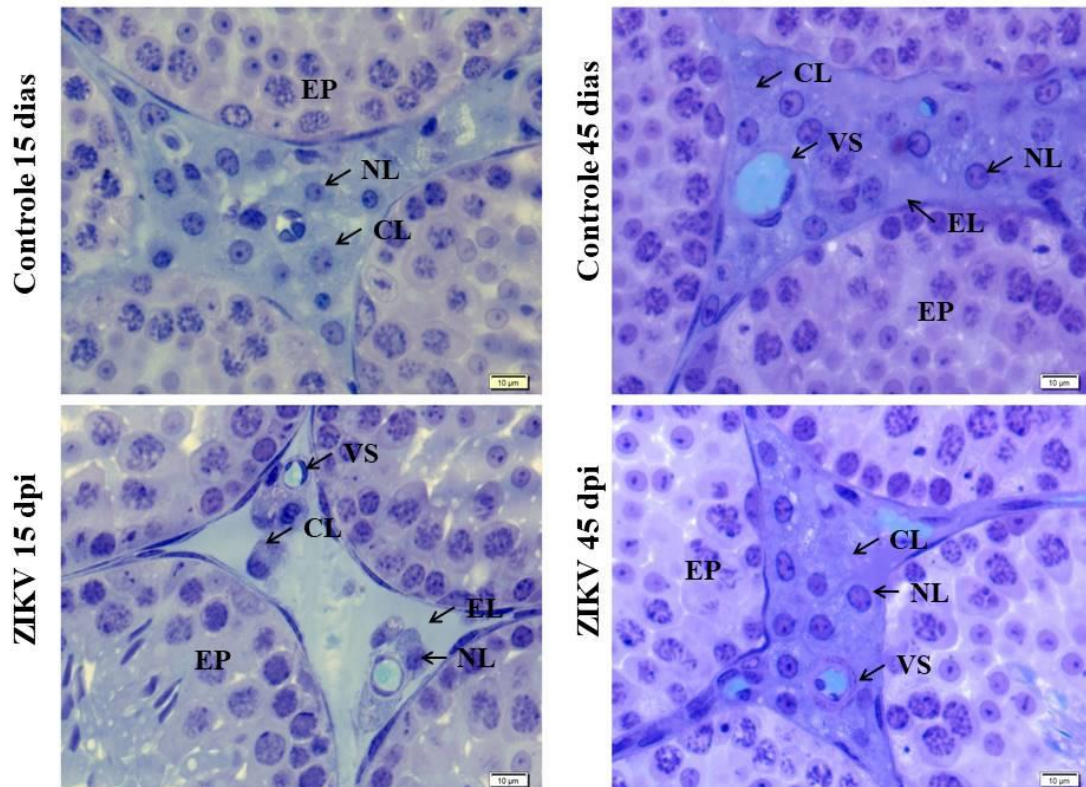


Figura 5: Fotomicrografias da estrutura e composição intertubular dos grupos Controles 15 e 45 dias, e tratados ZIKV 15 e 45 dpi (dias pós-infecção). NL- Núcleo de Célula de Leydig; CL- Citoplasma de Célula de Leydig; VS- Vaso sanguíneo; EP-Epitélio seminífero. Corte de 3 µm corados com Azul de toluidina. Barra: 10µm

Tabela 5. Proporção dos componentes do intertúbulo de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

	Controle 15 dias	ZIKV 15dpi	Controle 45 dias	ZIKV 45dpi
Intertúbulo (%)	9,43±0,53	8,60±0,75	8,58±1,19	8,65±1,01
Vaso sanguíneo (%)	0,55±0,19	0,72±0,16	0,44±0,14	0,44±0,24
Espaço Linfático (%)	0,39±0,22	1,66±0,69 *	0,49±0,29	0,92±0,50
Núcleo de Leydig (%)	1,14±0,12	1,00±0,20	1,04±0,24	0,82±0,12
Citoplasma de Leydig (%)	7,25±0,28	5,08±0,52 *	6,42±0,86	6,33±0,63
Célula de Leydig (%)	8,39±0,35	6,08±0,61 *	7,46±0,99	7,16±0,72
Conjuntivo (%)	0,09±0,05	0,13±0,05	0,18±0,07	0,12±0,06
Macrófago (%)	0,01±0,01	0,01±0,004	0,003±0,004	0,01±0,01

Dados expressos como média±DP. * entre tratamento e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

De acordo com os dados histomorfométricos e estereológicos das células de Leydig, o grupo ZIKV 15dpi teve reduções nos volumes de citoplasma de Leydig, de células de Leydig e de células de Leydig por testículo e por grama de testículo. O grupo ZIKV 45dpi não apresentou diferenças significativas em qualquer parâmetro (Tabela 6).

Tabela 6: Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

Célula de Leydig	Controle 15 dias	ZIKV 15dpi	Controle 45 dias	ZIKV 45dpi
Diâmetro Nuclear (μm^3)	4,11±0,19	3,88±0,20	4,38±0,14	4,23±0,22
Volume do Núcleo (μm^3)	36,50±5,22	30,84±4,78	44,18±4,39	39,89±6,17
Volume do citoplasma (μm^3)	233,81±32,36	158,54±27,14*	284,61±73,50	308,13±37,44
Volume da célula (μm^3)	270,31±36,36	189,38±28,65*	328,79±77,20	348,02±41,72
Volume / t ($\times 10^6$)	0,01±0,002	0,004±0,001*	0,01±0,002	0,01±0,03
Volume / gt ($\times 10^6$)	0,06±0,01	0,05±0,01*	0,06±0,01	0,07±0,01
Número / t ($\times 10^6$)	3,13x10 ⁷ ± 8,35x10 ⁶	1,98x10 ⁷ ± 6,29x10 ⁶	3,19x10 ⁷ ± 7,99x10 ⁶	2,14x10 ⁷ ± 7,11x10 ⁶
Número / gt ($\times 10^6$)	2,25x10 ⁸ ± 4,26x10 ⁷	2,73x10 ⁸ ± 6,03x10 ⁷ *	1,84x10 ⁸ ± 5,19x10 ⁷	2,08x10 ⁸ ± 3,28x10 ⁷
Índice Leydigossomático (%)	0,03±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01

Dados expressos como média±DP. * entre tratamento e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

Contagem de células no testículo e epidídimo

Não houve alterações no número de espermatídes por testículo e por grama de testículo no grupo ZIKV 45 dpi. Quanto à contagem espermática no epidídimo, houve redução no número de espermatozoides presentes na cabeça e no corpo por órgão e por grama de órgão. O tempo de trânsito na cabeça e no corpo também reduziu. Na região da cauda o número de espermatozoides por órgão e por grama de órgão diminuiu (Tabela 7).

Tabela 7: Parâmetros de contagem de células no testículo e epidídimo de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

	Controle 45 dias	ZIKV 45dpi
Número de espermátide /t	3,96±0,42	3,36±1,44
Número de espermátide /gt	59,96±11,69	57,63±30,23
PED/t	0,82±0,09	0,70±0,30
PED /gt	10,70±1,70	9,03±4,00
Número de espermatozoide CC/Org	2,05±0,61	0,05±0,08 *
Número de espermatozoide CC/gOrg	90,83±29,46	2,50±3,54 *
Tempo de trânsito CC (Dias)	2,51±0,64	0,06±0,08 *
Número de espermatozoide C/Org	1,30±0,77	0,42±0,32 *
Número de espermatozoide na C/gOrg	110,82±30,46	46,67±37,71 *
Tempo de trânsito C (dias)	1,50±0,85	0,74±0,38

PED: produção espermática diária. CC: cabeça e corpo do epidídimo. C:Cauda do epidídimo. Dados expressos como média±DP. * entre tratamentos indica que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

Motilidade e integridade de membrana do espermatozoide

O grupo ZIKV 45 dpi apresentou redução na motilidade espermática e no percentual de espermatozoides com membranas intactas (Figura 6).

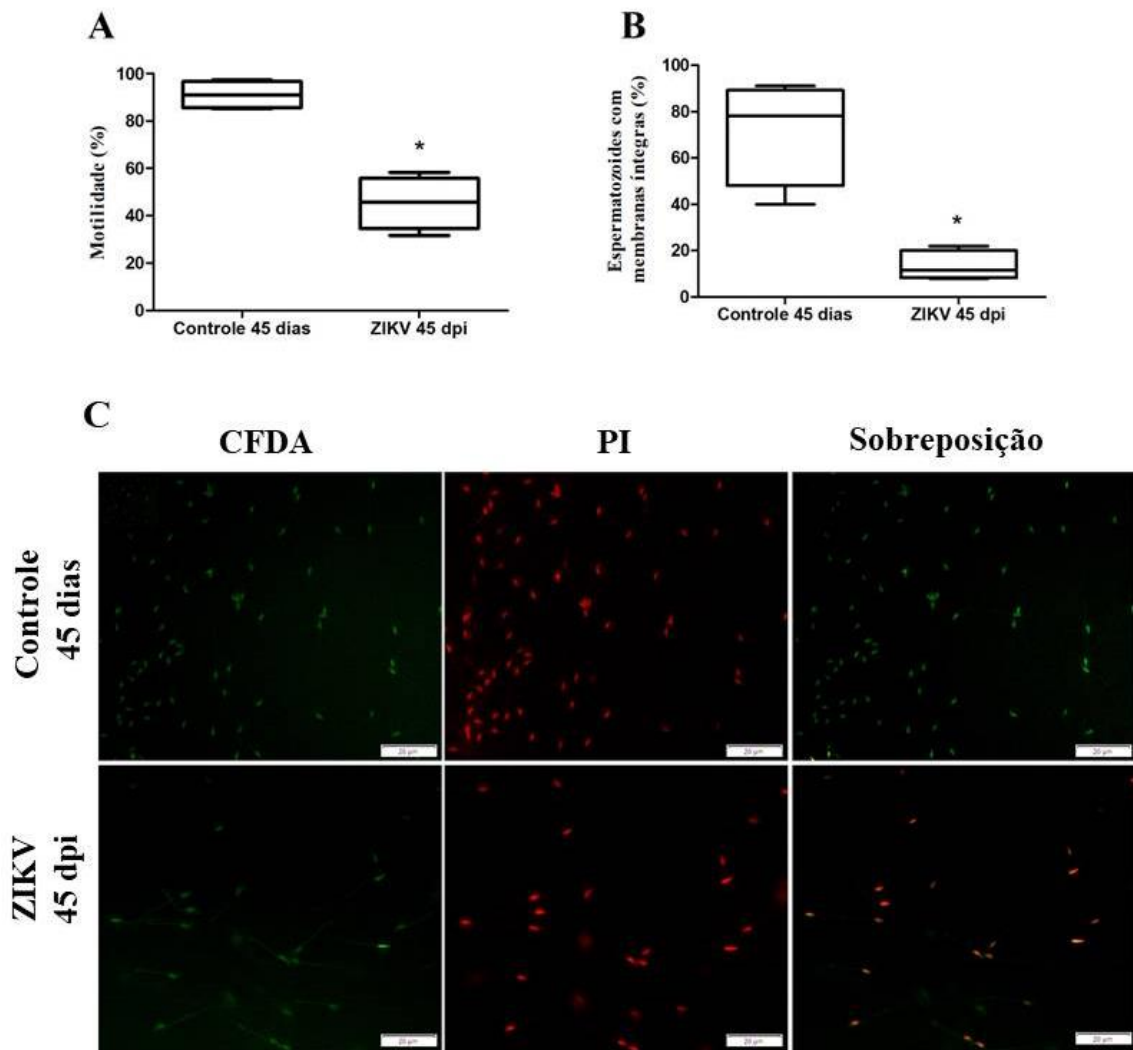


Figura 6: (A) Motilidade espermática e (B) integridade de membrana espermática, de camundongos Balb/c infectados com ZIKV; (C) Imagens dos espermatozoides dos grupos controle e tratado. Membrana acrossômica marcada com diacetato de carboxifluoresceína (CFDA, Verde); cabeça do espermatozoide não intacto marcada com iodeto de propídio (PI, Vermelho); Sobreposição - imagens de sobreposição. Barra= 20 μ m. ANOVA e Teste t. Barra= 20 μ m.

Estresse Oxidativo do testículo e epidídimo

O grupo ZIKV 15 dpi teve níveis elevados de SOD e redução de CAT, redução de NO e aumento de MDA na porção testicular. No epidídimo houve aumento da SOD e do MDA (Figura 7).

No grupo ZIKV 45dpi não foram observadas alterações no testículo e epidídimo, quanto aos níveis das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST) e marcadores de estresse oxidativo (NO e MDA) (Figura 8).

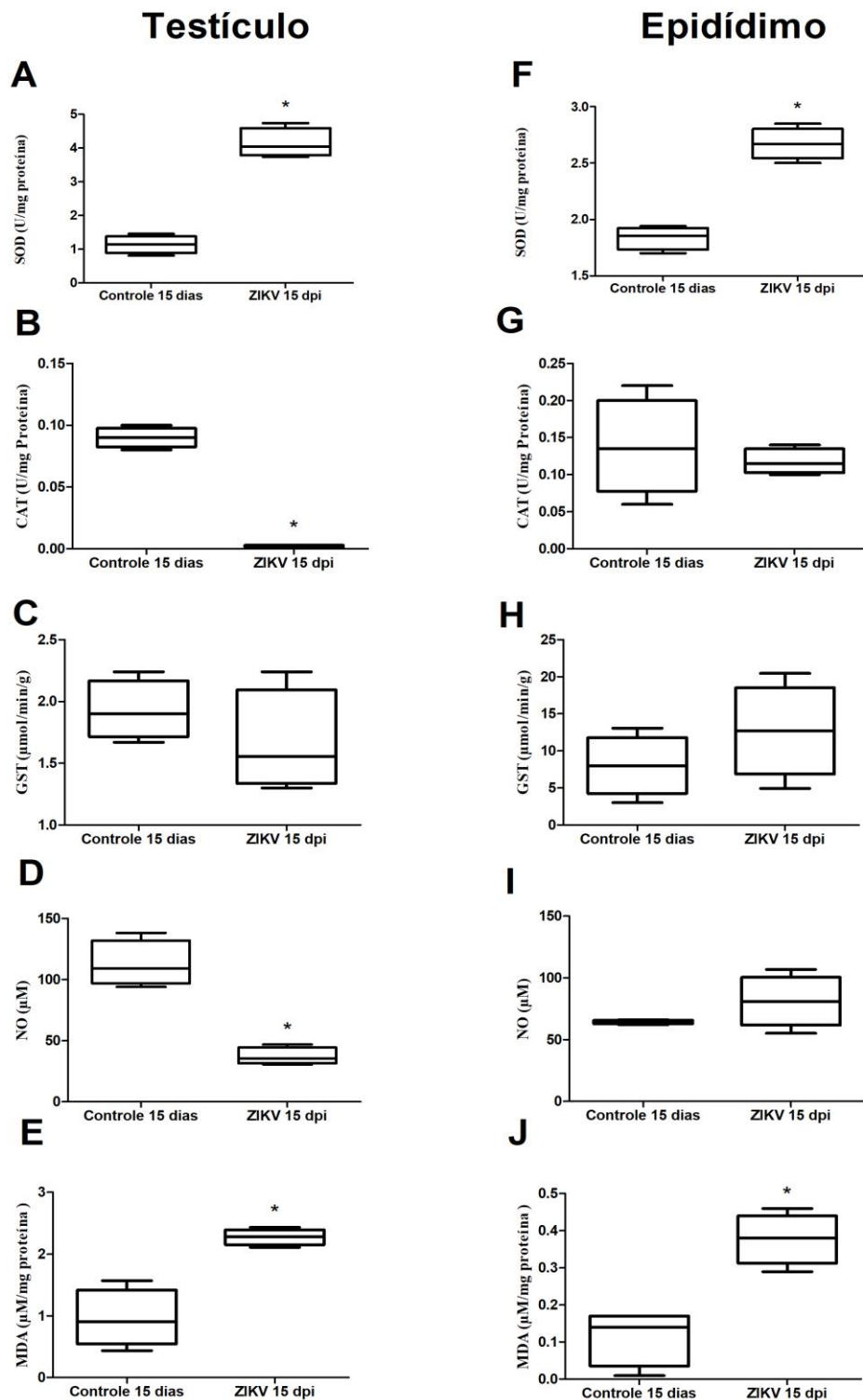


Figura 7: Avaliação do estresse oxidativo e nitrosativo no testículo e epidídimo de camundongos Balb/c infectados com ZIKV, 15 dias pós infecção. Atividade das enzimas antioxidantes: A e F - Superóxido dismutase (SOD); B e G - Catalase (CAT); C e H - Glutathione (GTS). Concentrações de óxido nítrico (ON) – D e I, –e malondialdeído (MDA) – E e J. * entre tratamento e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

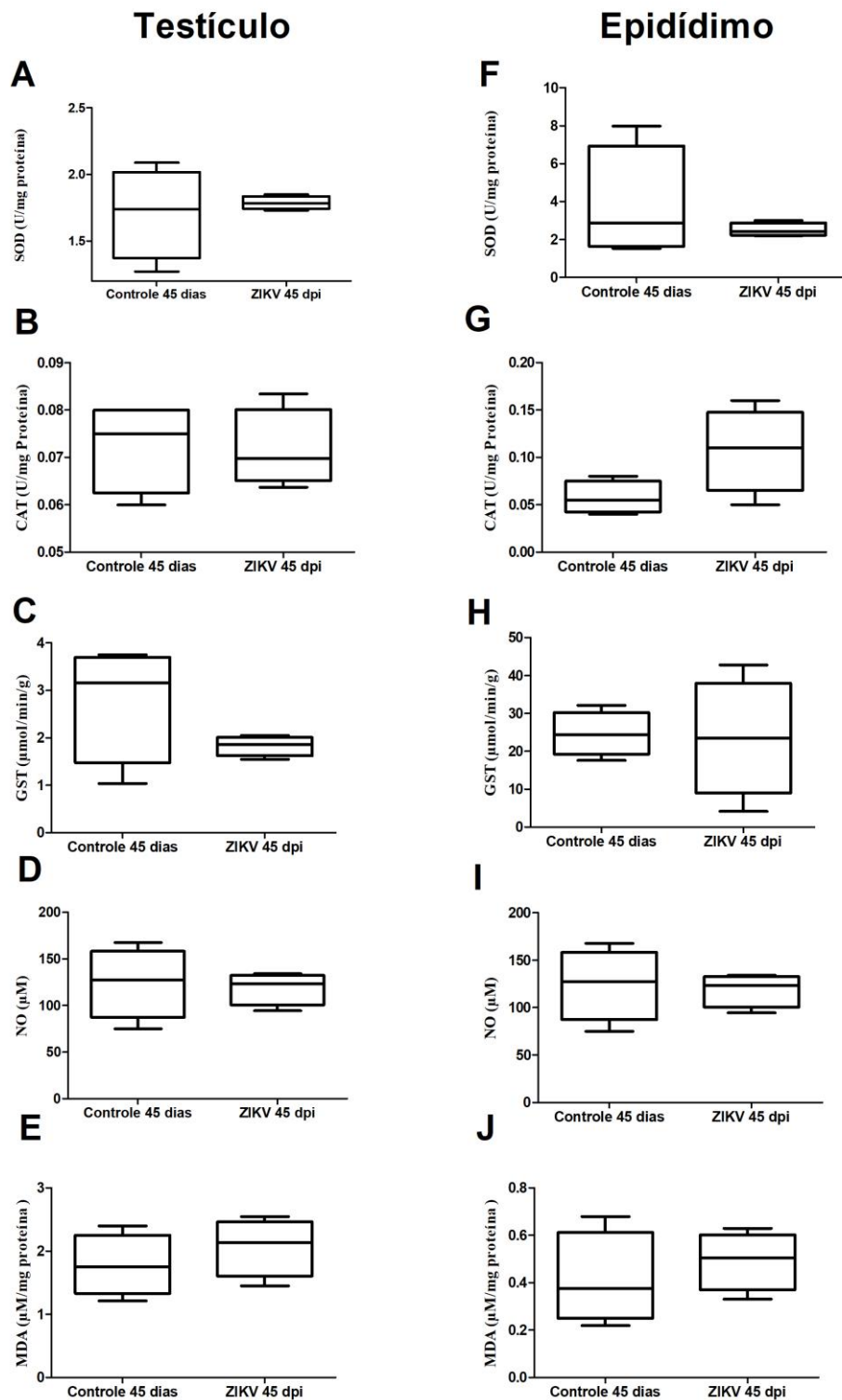


Figura 8: Avaliação do estresse oxidativo e nitrosativo no testículo e epidídimo de camundongos Balb/c infectados com ZIKV, 45 dias pós-infecção. Atividade das enzimas antioxidantes: A e F - Superóxido dismutase (SOD); B e G - Catalase (CAT); C e H - Glutaciona (GTS). Concentrações de óxido nítrico (ON) – D e I, e de malondialdeído (MDA) – E e J. * entre tratamento e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

Determinação da capacidade antioxidante total (FRAP)

Não foi observada diferença significativa da capacidade antioxidante total do soro nos grupos ZIKV 15dpi e 45dpi (Figura 9).

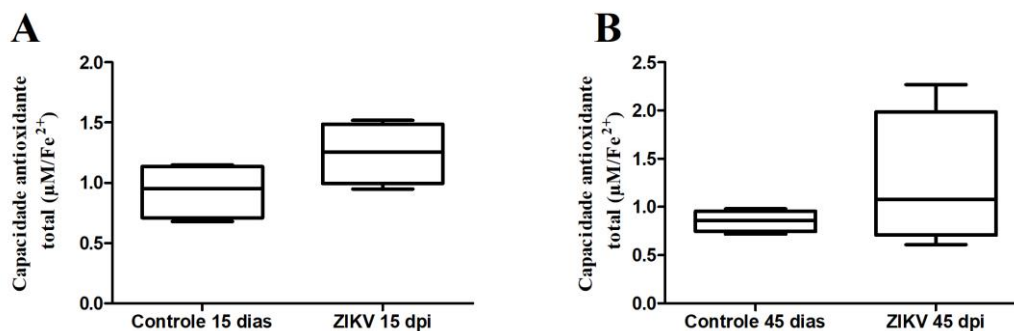


Figura 9: Capacidade antioxidante total do soro de camundongos Balb/c infectados ZIKV. * entre tratamento e controle, indicam valores que diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ANOVA e Teste t.

DISCUSSÃO

Estudos comprovaram os danos causados pelo ZIKV nos testículos e epidídimos e sua persistência no sêmen por até 370 dias (Govero et al., 2016; Barzon et al., 2018). Neste trabalho foi possível observar como o ZIKV interfere na estrutura testicular e na produção espermática e no armazenamento dos espermatozoides no epidídimo de animais imaturos infectados, e analisados em períodos pós-infecção diferentes, com o intuito de verificar a progressão ou regressão dos danos.

Os animais analisados 15dpi tiveram o peso corporal reduzido, como foi observado por Sheng et al. (2017) em animais infectados com ZIKV a partir de 5dpi. Os testículos também tiveram o peso reduzido nos animais 15dpi e tal resultado corrobora os achados de outros autores em animais infectados com ZIKV e analisados 14 e 15 dpi (Govero et al., 2016; Ma et al., 2016). Por consequência, o peso do parênquima testicular também reduziu. Devido ao período de desenvolvimento em que se encontravam os animais analisados em 45dpi, que é marcado por alta proliferação celular a partir de 33 dias de vida, quando ocorre o desenvolvimento dos espermatócitos, intenso aumento de túbulos seminíferos e sua diferenciação com o início da espermiogênese (Picut et al., 2018), o peso testicular não foi alterado, possibilitando então reverter a perda sofrida no início da infecção.

A redução do peso testicular observada aos 15 dpi foi acompanhada por um atraso na formação do lume tubular, possivelmente porque a partir de 2 dpi o vírus já se encontra no ambiente testicular (Aliota et al., 2016; Lima et al., 2022). Esta fase da vida do animal deveria ser marcada por rápida proliferação de células de Sertoli e espermatogônias, com a formação do lume tubular ocorrendo em torno do 20º dia de idade (Picut et al., 2018). Como a infecção ocorreu no período crítico de desenvolvimento testicular, mudanças morfométricas puderam ser observadas nos animais 15 dpi, de modo que houve redução no diâmetro tubular, na altura do epitélio seminífero e no diâmetro de lume, além das reduções das áreas de túbulo, lume e epitélio. Silva et al. (2020) também encontraram essas alterações em camundongos adultos infectados com ZIKV e analisados 7 dpi. Camargos et al. (2019) também observaram redução do diâmetro tubular de camundongos infectados verticalmente e analisados com 12 semanas de vida.

Embora os parâmetros tubulares citados acima tenham reduzidos, os percentuais de túbulo e de epitélio aumentaram no grupo de 15 dpi, provavelmente porque o túbulo seminífero ficou mais contorcido dentro de um espaço testicular menor, visto que o comprimento de túbulo seminífero não foi alterado e peso testicular reduziu em 50%.

Neste trabalho não foi possível verificar perda de células germinativas ou de Sertoli de acordo com a contagem no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero no grupo 45 dpi, indicando que houve renovação celular ou as células suportaram bem a replicação viral, uma vez que espermatogônias, espermátócitos primários e as células de Sertoli são alvo para a replicação (Govero et al., 2016).

As células de Sertoli são responsáveis pela constituição da barreira hematotesticular e formam um ambiente imunoprivilegiado para a espermatogênese (Picut et al., 2018). Embora as células de Sertoli atuem como reservatório para o ZIKV, a barreira não é afetada diretamente pelo vírus, mas por mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos infectados que degradam a proteína ZO-1 (Siemann et al., 2017). A perda da barreira hematotesticular compromete toda a espermatogênese, podendo resultar no surgimento de vacúolos entre as células germinativas o que pode causar deslocamento e desordem no epitélio germinativo, pois os espermátócitos podem perder a aderência com a célula de Sertoli, resultando em descamação de células para o lume do túbulo (Lanning et al., 2002).

As análises histopatológicas neste trabalho confirmam que houve perturbações na barreira hematotesticular no grupo ZIKV 45 dpi, o que causou aumento de histopatologias moderadas e redução de túbulos normais. O aumento da desorganização epitelial pode estar

relacionado ao período da infecção, pois a barreira hematotesticular é formada aos 20 dias de idade (Picut et al., 2018). Os resultados da viabilidade, com redução das células viáveis, mostram que o órgão não conseguiu se recuperar até os momentos analisados.

A organização da região intertubular é complexa e conta com um vasto espaço linfático testicular que circunda cada túbulo seminífero, mas sem comunicações celulares entre eles. Assim, caso alguma célula tente entrar nos túbulos seminíferos, precisa primeiro ter acesso ao espaço linfático (Clark, 1976). Devido à infecção pelo ZIKV, e ao possível aumento de tráfego celular das células imunes na região intertubular, o espaço linfático aumentou consideravelmente nos animais analisados 15dpi, pois o microambiente do testículo é sensível às respostas inflamatórias e a drenagem linfática pode não ter sido eficiente durante o processo inflamatório (Hirai et al., 2012). Assim, o espaço intertubular, além de conter as células de Leydig que sintetizam a testosterona, também contém as células imunes como linfócitos, macrófagos, células dendríticas e mastócitos, que protegem os testículos de agentes patogênicos oriundos do sangue (Li et al., 2012).

As células de Leydig podem servir como local de replicação do ZIKV, atuando como reservatório (Uraki et al., 2017). Govero et al. (2016) observaram redução na população das células de Leydig aos 21 dpi, o que também foi visto neste trabalho com a redução do número de células de Leydig por grama de testículo e reduções de volume e citoplasma das células aos 15 dpi podendo, inclusive, ter comprometido a produção e secreção de testosterona. Esta alteração dos níveis de testosterona foi evidenciada por Govero et al. (2016) que avaliaram camundongos de 7 semanas infectados com ZIKV e analisados no 7 dpi encontrando níveis de testosterona elevados, sendo que no 14 dpi os níveis diminuíram e permaneceram baixos no 21 dpi, provavelmente pela alteração do funcionamento das células de Leydig, ou devido ao processo inflamatório associado à replicação viral. Por outro lado, no grupo analisado aos 45 dpi, tais alterações não estão mais presentes, o que deve estar relacionado à proliferação típica desse período, pois as células de Leydig imaturas passam por uma ou duas divisões mitóticas até 56 dias de idade, e amadureceram para células de Leydig adultas, aumentando assim a população celular (Whitney, 2012).

A disseminação do ZIKV nos testículos é responsável por causar perturbações nos níveis das enzimas antioxidantes, como observado no grupo 15 dpi com o aumento da SOD e a redução da CAT. Tais alterações não foram suficientes para normalizar os níveis elevados de MDA, indicador de peroxidação lipídica. Entretanto, a peroxidação lipídica não foi suficiente para causar alterações na produção espermática e na contagem de espermátides

resistentes observadas no grupo 45 dpi. As espermátides imaturas são infectadas pelo ZIKV, mas uma vez que se diferenciam em espermatozoides, o RNA do ZIKV não é replicado mais (McDonald et al., 2018).

Como resultado do processo de estresse oxidativo ocorrido nos animais analisados 15 dpi, houve redução nos níveis de NO, pois a infecção viral é responsável por causar a injúria celular pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), e que em altas concentrações são capazes de reduzir os níveis de NO por inativação química (Pierini & Bryan, 2015; Ivanov et al., 2017). As EROs são responsáveis por danificar os espermatozoides na sua estrutura e função (Kodama et al., 1997), como visto no grupo ZIKV 45 dpi, pela contagem reduzida de espermatozoides nas regiões de cabeça, corpo e cauda do epidídimo e pela redução da motilidade espermática. Na tentativa da SOD catalisar o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), este se torna altamente danoso ao DNA mitocondrial e faz com que a produção de ATP diminua afetando a motilidade espermática (Morielli & O'Flaherty, 2015).

A integridade de membrana reduzida nos espermatozoides também pode estar relacionada ao H_2O_2 , pois há grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana plasmática e este local tem grande potencial para ocorrer desordens na estrutura da membrana citoplasmática (Bisht et al., 2017). A aceleração do tempo de trânsito observada na região da cabeça e do corpo do epidídimo faz com que os espermatozoides tenham exposição mínima ao microambiente epididimário e a maturação seja afetada, com redução o potencial de fertilidade (Fernandez et al., 2008).

Devido à presença do ZIKV no epidídimo, o estresse oxidativo também ocorreu como indicado por níveis elevados de MDA no grupo ZIKV 15dpi. As células epiteliais do epidídimo são alvos de replicação do ZIKV e foi observado após 8 e 10 dpi que os leucócitos também são alvos para a replicação viral, o que pode explicar a presença do vírus no sêmen (McDonald et al., 2018). O epidídimo também possui a barreira hematoepididimária, com a função de proteger os espermatozoides do ataque de células imunes e patógenos, mas essa barreira é menos eficiente do que a barreira hematotesticular, pois células imunes atravessam e podem ser vistas no lume do epidídimo (Hedger, 2011). Foi possível determinar que o estresse oxidativo ocorreu no testículo e no epidídimo, mas não de forma sistêmica em nenhum dos dois tempos pós-infecção, uma vez que o FRAP, indicativo da quantidade total de antioxidante não enzimático presente no organismo, não foi alterado (Samudi et al., 2009)

CONCLUSÕES

Concluimos que o ZIKV teve forte interferência na microarquitetura testicular nos animais analisados 15 dpi, sendo capaz de atrasar o desenvolvimento dos túbulos seminíferos e promover o estresse oxidativo, tanto no testículo quanto no epidídimo, causando alterações importantes nos espermatozoides como redução na motilidade, integridade de membrana comprometida e redução no número de espermatozoides presentes nas regiões epididimárias. Porém, de acordo com os resultados obtidos dos animais analisados 45 dpi, pode ser observada recuperação na maioria dos parâmetros alterados, mas ainda assim a fertilidade desses animais ficou comprometida devido à baixa qualidade dos espermatozoides.

REFERÊNCIAS

- Aliota, M. T., Caine, E. A., Walker, E. C., Larkin, K. E., Camacho, E., & Osorio, J. E. (2016). Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(4), 1–11.
- Barzon, L., Percivalle, E., Pacenti, M., Rovida, F., Zavattoni, M., Del Bravo, P., Cattelan, A. M., Palù, G., & Baldanti, F. (2018). Virus and Antibody Dynamics in Travelers with Acute Zika Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases*, *66*(8),
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., & Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*, *14*(8), 470–485.
- Camargos, V. N., Foureaux, G., Medeiros, D. C., da Silveira, V. T., Queiroz-Junior, C. M., Matosinhos, A. L. B., Figueiredo, A. F. A., Sousa, C. D. F., Moreira, T. P., Queiroz, V. F., Dias, A. C. F., Santana, K. T. O., Passos, I., Real, A. L. C. V., Silva, L. C., Mourão, F. A. G., Wnuk, N. T., Oliveira, M. A. P., Macari, S., ... Souza, D. G. (2019). In-depth characterization of congenital Zika syndrome in immunocompetent mice: Antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy. *EBioMedicine*, *44*, 516–529.
- Clark, R. V. (1976). Three-dimensional organization of testicular interstitial tissue and lymphatic space in the rat. *The Anatomical Record*, *184*(2), 203–225.
- Dick G. (1952). Zika isolation and serological specificity. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, *46*(5), 509–520.
- Duggal, N. K., Ritter, J. M., Pestorius, S. E., Zaki, S. R., Davis, B. S., Chang, G. J. J., Bowen, R. A., & Brault, A. C. (2017). Frequent Zika Virus Sexual Transmission and Prolonged Viral RNA Shedding in an Immunodeficient Mouse Model. *Cell Reports*, *18*(7), 1751–1760.
- Fernandez, C. D. B., Porto, E. M., Arena, A. C., & De Kempinas, W. G. (2008). Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International Journal of Andrology*, *31*(4), 427–437.
- Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S. M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D. J., Gorman, M. J., Richner, J. M., Caine, E. A., Salazar, V., Moley, K. H., & Diamond, M. S. (2016). Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*, *540*(7633), 438–442.
- Hedger, M. P. (2011). Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *Journal of Andrology*, *32*(6), 625–640.
- Hirai, S., Naito, M., Terayama, H., Qu, N., Kuerban, M., Musha, M., Ikeda, A., Miura, M., &

- Itoh, M. (2012). The origin of lymphatic capillaries in murine testes. *Journal of Andrology*, 33(4), 745–751.
- Ivanov, A. V., Bartosch, B., & Isaguliants, M. G. (2017). Oxidative stress in infection and consequent disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 10–13.
- Joguét, G., Mansuy, J. M., Matusali, G., Hamdi, S., Walschaerts, M., Pavili, L., Guyomard, S., Prisant, N., Lamarre, P., Dejucq-Rainsford, N., Pasquier, C., & Bujan, L. (2017). Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(11), 1200–1208.
- Kodama, H., Kasai, H., Yamaguchi, R., Tanaka, T., & Fukuda, J. (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility*, 68(3), 519–524.
- Kumar, A., Jovel, J., Lopez-Orozco, J., Limonta, D., Airo, A. M., Hou, S., Stryapunina, I., Fibke, C., Moore, R. B., & Hobman, T. C. (2018). Human Sertoli cells support high levels of zika virus replication and persistence. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11.
- Lanning, L. L., Creasy, D. M., Chapin, R. E., Mann, P. C., Barlow, N. J., Regan, K. S., & Goodman, D. G. (2002). Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30(4), 507–520.
- Lemke, G., & Rothlin, C. V. (2008). Immunobiology of the TAM receptors. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 327–336.
- Li, N., Wang, T., & Han, D. (2012). Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. *Frontiers in Immunology*, 3(JUN), 1–12.
- Lima, M. L. D., Cabral, Á. S., Bittar, C., Falleiros Junior, L. R., Guerra, L. H. A., Carneiro, B. M., de Souza Ferreira, L. C., Nogueira, M. L., Taboga, S. R., Calmon, M. F., & Rahal, P. (2022). Early infection of Zika virus in the male reproductive system of AG129 mice: molecular and immunohistochemical evaluation. *Brazilian Journal of Microbiology*.
- Ma, W., Li, S., Ma, S., Jia, L., Zhang, F., Zhang, Y., Zhang, J., Wong, G., Zhang, S., Lu, X., Liu, M., Yan, J., Li, W., Qin, C., Han, D., Qin, C., Wang, N., Li, X., & Gao, G. F. (2016). Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell*, 167(6), 1511–1524.e10.
- MacNamara, F. N. (1954). Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(2), 139–145.
- Marano, G., Pupella, S., Vaglio, S., Liembruno, G. M., & Grazzini, G. (2016). Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and

- Transfusion Medicine. *Blood Transfusion*, 14(2), 95–100.
- Masmejan, S., Musso, D., Vouga, M., Pomar, L., Dashraath, P., Stojanov, M., Panchaud, A., & Baud, D. (2020). Zika Virus. *Pathogens*, 9(11), 1–14.
- McDonald, E. M., Duggal, N. K., Ritter, J. M., & Brault, A. C. (2018). Infection of epididymal epithelial cells and leukocytes drives seminal shedding of Zika virus in a mouse model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(8), 1–22.
- Morielli, T., & O’Flaherty, C. (2015). Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. *Reproduction*, 149(1), 113–123.
- Musso, D., Ko, A. I., & Baud, D. (2019). Zika Virus Infection — After the Pandemic. *New England Journal of Medicine*, 381(15), 1444–1457.
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V. M. (2015). Potential sexual transmission of zika virus. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2), 359–361.
- Picut, C. A., Ziejewski, M. K., & Stanislaus, D. (2018). Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. *Birth Defects Research*, 110(3), 190–227.
- Pierini, D. ., & Bryan, N. S. (2015). Nitric Oxide Availability as a Marker of Oxidative Stress. *Advanced Protocols in Oxidative Stress III*, 1208, 1–477.
- Prasad, V. M., Miller, A. S., Klose, T., Sirohi, D., Buda, G., Jiang, W., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2017). Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nature Structural and Molecular Biology*, 24(2), 184–186.
- Samudi, C., Govind, S. K., Bustam, A. Z., & Kuppusamy, U. R. (2009). Attenuation of hydrogen peroxide and ferric reducing/antioxidant power serum levels in colorectal cancer patients with intestinal parasitic infection. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 16(2), 15–20.
- Sheng, Z. Y., Gao, N., Wang, Z. Y., Cui, X. Y., Zhou, D. S., Fan, D. Y., Chen, H., Wang, P. G., & An, J. (2017). Sertoli cells are susceptible to ZIKV infection in mouse testis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUN), 1–13.
- Siemann, D., Strange, D., Maharaj, P., Shi, P. Y., & Verma, S. (2017). Zika Virus Infects Human Sertoli Cells. *Journal of Virology*, 91(22), 1–17.
- Silva, A. A. (2020). A infecção pelo vírus ZIKA causa alterações morfológicas testiculares e espermáticas em camundongos BALB/C adultos. Universidade Federal de Pernambuco.p.74. (Dissertação, metrado)

- Tsetsarkin, K. A., Maximova, O. A., Liu, G., Kenney, H., Teterina, N., Bloom, M. E., Grabowski, J. M., Mlera, L., Nagata, B. M., Moore, I., Martens, C., Amaro-Carambot, E., Lamirande, E. W., Whitehead, S. S., & Pletnev, A. G. (2018). Routes of Zika virus dissemination in the testis and epididymis of immunodeficient mice. *Nature Communications*, 9(1), 1–13.
- Uraki, R., Hwang, J., Jurado, K. A., Householder, S., Yockey, L. J., Hastings, A. K., Homer, R. J., Iwasaki, A., & Fikrig, E. (2017). Zika virus causes testicular atrophy. *Science Advances*, 3(2), 1–7.
- Whitney, K. M. (2012). Testicular histopathology in juvenile rat toxicity studies. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(1), 51–56.

CAPÍTULO 3:

Estresse oxidativo e nitrosativo gerado pela infecção por MAYV em camundongos adultos altera parâmetros espermáticos em camundongos Balb/c adultos

RESUMO

O MAYV pertence ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*, e o quadro clínico da doença por ele provocada é muito debilitante, por causar artralgia, febre alta, dor de cabeça e dor nos olhos. O MAYV tem grande potencial para expandir em ambiente urbano, pois pode ser transmitido por mosquitos *Aedes aegypti*. É importante destacar que as infecções causadas por arboviroses podem afetar a saúde reprodutiva masculina causando infertilidade. Neste contexto, avaliamos os efeitos da infecção do MAYV 42 dias pós-infecção (dpi) no testículo e epidídimo de camundongos Balb/c adultos (60 dias de idade) infectados por via direta. Vinte e quatro camundongos foram divididos em três grupos experimentais (n=8/grupo), sendo: Grupo Controle, Grupo Dexa (fosfato de dexametasona), Grupo infectado com MAYV. Observou-se redução na porcentagem de epitélio seminífero no grupo MAYV e aumento na porcentagem de túnica própria nos grupos Dexa e MAYV. O número de espermátides arredondadas, o índice meiótico, a produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foram reduzidos no grupo MAYV, mas houve aumento das células de Sertoli por grama de testículo. Também houve aumento de histopatologias, danos iniciais e morte celular no grupo MAYV. O diâmetro e volume das células de Leydig aumentaram no grupo MAYV. O número de espermátides por testículo reduziu nos grupos Dexa e MAYV. Já a produção espermática diária e o número de espermatozoides na região da cabeça e corpo do epidídimo foram reduzidos no grupo MAYV. O número de espermatozoides na cauda do epidídimo reduziu nos grupos Dexa e MAYV, e o tempo de trânsito diminuiu apenas no grupo Dexa. Houve redução da motilidade e integridade de membrana no grupo MAYV. No testículo observou-se aumento na atividade da enzima catalase (CAT) nos grupos Dexa e MAYV, redução da atividade da glutathione S-transferase (GST) no grupo Dexa, aumento dos níveis de NO no grupo MAYV e redução dos níveis de MDA nos grupos Dexa e MAYV. No epidídimo, houve aumento da CAT e MDA no grupo MAYV e aumento de NO nos grupos Dexa e MAYV. O FRAP (capacidade redutora férrica no plasma) aumentou no grupo MAYV. Concluímos que o MAYV causou danos ao sistema reprodutor masculino aos 42 dpi, com danos tubulares, alterações nas células de Leydig, estresse nitrosativo no testículo e epidídimo e estresse oxidativo no epidídimo.

INTRODUÇÃO

O aumento das arboviroses nas últimas décadas vem acompanhado do aumento das viagens internacionais. O vírus da dengue (DENV) e chikungunya (CHIKV), por exemplo, deixaram de estar confinados às áreas tropicais, expandindo assim o seu domínio (Weaver & Reisen, 2010; Mayer et al., 2017). Os arbovírus que evoluíram e se diversificaram nos trópicos são causadores de grandes surtos, pois as cepas se tornaram altamente virulentas e invasivas, criando um problema de saúde pública (Weaver & Reisen, 2010). Ainda que os arbovírus sejam uma ameaça, alguns vírus como o Mayaro (MAYV) ainda permanecem negligenciados com a subestimação da sua distribuição (Mota et al., 2015).

O MAYV pertence ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*, está diretamente ligado ao CHIKV com o quadro clínico da doença bastante semelhante, marcado por ser muito debilitante e por causar erupções cutâneas e artralgia. A doença do MAYV também pode ser confundida com a DENV por causa da febre alta, dor de cabeça e dor nos olhos (Tesh et al., 1999; Coimbra et al., 2007). O MAYV tem grande potencial para expandir em ambiente urbano, pois pode ser transmitido por mosquitos *Aedes aegypti* (Lopes et al., 2014). Diagnósticos equivocados da doença ocorrem devido aos poucos dados que estão disponíveis descrevendo sua difusão e propagação (Mota et al., 2015).

É importante destacar que as infecções causadas por arboviroses podem afetar a saúde reprodutiva masculina causando infertilidade, como a infecção pela caxumba que causa cessação da espermatogênese, e pelo ZIKV, com alterações morfofisiológicas nos espermatozoides (Govero et al., 2016; Puggioni et al., 2018; Wu et al., 2019). No entanto, pesquisas com MAYV são poucas e estão limitadas a estudos clínicos com foco em artralgia (Azevedo et al., 2009; Halsey et al., 2013). Até o momento sabe-se que o MAYV infecta preferencialmente os macrófagos (De Castro-Jorge et al., 2019). Os macrófagos testiculares possuem relação direta com as células de Leydig presentes no compartimento intertubular dos testículos, e juntos, tais células têm forte influência na fertilidade masculina (Hutson, 1992; Heinrich & DeFalco, 2020). Neste contexto, avaliamos os efeitos da infecção do MAYV 42 dias pós-infecção nos testículo e epidídimo e como esta infecção afeta o funcionamento do sistema reprodutor masculino de camundongos Balb/c adultos infectados por via direta.

MATERIAL E MÉTODOS

Estoque e título viral

A cepa do vírus Mayaro (ATCC VR-66, strain TR 4675) foi propagada utilizando-se células de *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC CRL 1660), cultivada em meio L15 (*Leibovitz*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em garrafas de 75 cm², a 28 °C.

O título viral foi determinado por meio da contagem de placas de lise. Para tal, células Vero (ATCC CCL-81), cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% SFB, foram plaqueadas em placas de 24 poços (2x10⁶ células) e mantidas a 37°C e 5% CO₂ até atingirem cerca de 80% de confluência. Foi realizada a diluição seriada decimal de uma alíquota do estoque viral, aplicando-se 100 µL de cada diluição em triplicata à placa. O controle positivo foi determinado como apenas células e meio, sem a adição do vírus. A placa foi incubada a temperatura ambiente, por 1 hora sob agitação constante, para adsorção viral. Após remoção do sobrenadante, 1 mL de solução de CMC 3% (carboximetilcelulose 3% diluído em meio DMEM incompleto na proporção 1:2) foi adicionado a cada poço. A seguir, incubou-se a placa em estufa a 37°C e 5% CO₂, por 48 horas. Os efeitos citopáticos serão monitorados durante este período. Para a fixação das células, utilizou-se solução de formaldeído 20%, adicionando 1 mL em cada poço. A placa foi incubada por 1 hora, a 37°C, e corada com cristal violeta 5%. O título viral foi determinado por meio da fórmula:

$$T = (m \times d)/v$$

em que: T: título viral; m: média das placas de lise contadas; d: inverso da diluição escolhida, v: volume adicionado (mL).

O título viral foi expresso em Unidades Formadoras de Placa por mililitro (PFU/mL).

Grupos experimentais

O experimento seguiu as normas determinadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (protocolo 70/2019). Vinte e quatro camundongos machos Balb/c adultos (36g; 60 dias de idade) foram divididos em 3 grupos experimentais (n=8/grupo), sendo: Grupo Controle, Grupo Dexa (fosfato de dexametasona) e Grupo infectado com MAYV. Os animais de cada grupo foram alojados em gaiolas coletivas e eutanasiados aos 42 dias pós-infecção.

Os animais infectados receberam o fosfato de dexametasona (35mg/kg) 3 dias antes da infecção e, no 4º dia, foram infectados. Foram inoculados na região axilar 50µl de MAYV na concentração de $1,25 \times 10^7$ PFU. Receberam o fosfato de dexametasona por mais 9 dias pós infecção, a fim de reduzir a resposta imune do animal e facilitar a contaminação. O grupo Controle recebeu o meio de cultura na região intraperitoneal no 4º dia para simular o estresse da infecção e o grupo dexametasona recebeu apenas a dexametasona e, no dia da infecção, recebeu apenas meio de cultura.

Coleta do material biológico

Os animais de cada grupo foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte), anestesiados com tiopental (i.p., 30mg/kg) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado e centrifugado a $4.119 \times g$ por 15 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado em microtubos e congelado a -80°C . Os testículos foram retirados, dissecados e pesados, sendo 6 testículos direitos fixados em Karnovsky (glutaraldeído 4% e paraformaldeído 4%) para análises histológicas e 6 testículos esquerdos congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer (-80°C) para análises de estresse oxidativo. Para a análise de trânsito espermático, 4 testículos e epidídimos foram armazenados a -20°C , e 5 epidídimos foram utilizados para análise de motilidade espermática e integridade de membrana.

Microscopia de luz

Fragmentos do testículo foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica). Secções de $3\mu\text{m}$ de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica), respeitando-se intervalos de $39\mu\text{m}$ entre os cortes, que foram corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. Imagens digitais foram obtidas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX - 53, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan) e a morfometria foi realizada através do software Image J (National Institute of Health, USA).

Biometria corporal e testicular

Depois de fixado, o testículo foi pesado, a albugínea retirada e pesada, descontando seu peso do testículo inteiro. Com o peso corporal e testicular foi calculado então o índice

gonadossomático (IGS), que representa o percentual de peso corporal alocado em gônadas, a partir da fórmula:

$$\text{IGS (\%)} = \frac{\text{Peso total das gônadas}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

Através do peso do parênquima testicular (peso testicular – peso da albugínea) e do peso corporal foi calculado o índice parenquimossomático (IPS) através da equação:

$$\text{IPS (\%)} = \frac{\text{Peso do parênquima dos dois testículos}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

Proporção de túbulos seminíferos em formação

Para a proporção de túbulos seminíferos em formação foram contabilizados 200 túbulos dos animais 15 dpi analisados, sendo os túbulos classificados da seguinte forma: com lume e sem lume.

Histomorfometria testicular

A proporção volumétrica dos componentes dos túbulos seminíferos foi calculada a partir de uma grade com 266 intercessões (pontos), em 10 campos aleatórios, totalizando 2660 pontos por animal. Foram contabilizados pontos sobre a túnica própria, epitélio seminífero, lúmen e intertúbulo. Para calcular a proporção volumétrica dos componentes testiculares foi utilizada a seguinte fórmula: Proporção volumétrica (%) = (NT / NTT) x 100, onde NT= Registro do número de pontos contados sobre o componente e NTT= Número de pontos totais contados.

O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado considerando o percentual ocupado por cada constituinte multiplicado pelo volume do parênquima testicular. Para o diâmetro tubular médio, foram medidos, aleatoriamente, 20 túbulos seminíferos que apresentavam forma mais circular possível. Para a altura do epitélio seminífero, a mensuração se deu pela distância da túnica própria até o lúmen, em duas medidas diametralmente opostas, utilizando-se as mesmas secções transversais usadas para medir o diâmetro tubular.

Para os cálculos das áreas tubular (ART), luminal (ARL) e epitelial (ARE) foram utilizadas as seguintes equações: ART= $\pi \cdot RT^2$ (RT= raio tubular); ARL= $\pi \cdot RL^2$ (RL= raio luminal); ArE = ArT – ArLU e a Relação T/E= ArT/ArE. O comprimento total dos túbulos

seminíferos, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal (Dorst & Sajonski, 1974). O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da fórmula: CTT/g = Comprimento total de túbulos /Peso bruto dos testículos (g).

Contagem das células no estágio 1

As células germinativas tais como espermatogônias do tipo A (A), espermatócitos primários em preleptóteno / leptóteno (PL / L), espermatócitos primários em paquíteno (P), espermatídes arredondadas (RS) e as células de Sertoli (S), foram quantificadas em secções transversais de 20 túbulos seminíferos no estágio I por animal. Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos das células germinativas e de 30 nucléolos das células de Sertoli. Os resultados foram corrigidos de acordo com as variações do tamanho das células e espessura do corte pela seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}}$$

DM= diâmetro nuclear (nucleolar) médio.

Para avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli, foram estimadas razões a partir dos números corrigidos das células germinativas e de Sertoli (Dias et al., 2019). As seguintes razões foram utilizadas: coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL/L:SGA); rendimento geral da espermatogênese (EAR: SGA); índice meiótico (EAR:PAQ); índice de célula de Sertoli (EAR: SER); capacidade total de suporte da célula de Sertoli (SGA + PL/L + PAQ + EAR:SER).

O número de células de Sertoli foi estimado a partir do número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio I e do comprimento total de túbulos seminíferos segundo a fórmula:

$$NCS = \frac{CTS (\mu\text{m}) \times N^{\circ} \text{ corrigido de nucléolos de cel. de Sertoli por secção transversal}}{\text{Espessura do corte } (\mu\text{m})}$$

CTS= Comprimento total de túbulos seminíferos (μm).

A partir desse cálculo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo. A produção espermática diária (PED) foi calculada segundo AMANN e ALMQUIST (1961), de acordo com a fórmula:

$$\text{PED} = \text{Volume de túbulo seminífero } (\mu\text{m}^3) \times \text{Número corrigido de espermatídes arredondadas} / \text{Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias)} \times \text{Área da secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 } (\mu\text{m}^2) \times \text{espessura do corte histológico } (\mu\text{m}).$$

Os valores por grama de testículo foram estimados dividindo a PDE pelo peso testicular.

Histopatologia testicular

Foram utilizados 200 túbulos seminíferos analisados aleatoriamente, por animal. As alterações patológicas existentes nos testículos foram classificadas utilizando-se o score descrito por Johnsen (1970), modificado para 8 níveis (Dias et al., 2019): Nível 1- túbulos íntegros, com células germinativas dispostas no seu sítio de localização normal e poucos vacúolos; Nível 2- vacúolos na base do epitélio; Nível 3- vacúolos no ápice do epitélio; Nível 4- vacúolos na base e no ápice do epitélio; Nível 5- células germinativas no interior do lúmen e presença de células em processo de degeneração; Nível 6- epitélio apenas com células basais; Nível 7- epitélios apenas com células de Sertoli; Nível 8- túbulos seminíferos desprovidos de células de Sertoli ou germinativas. Os níveis foram agrupados como: normais (nível 1), com patologias leves (níveis 2 e 3), com patologias moderadas (níveis 4 e 5) e com patologias severas (níveis 6, 7 e 8).

Viabilidade das Células Germinativas

Para análise da viabilidade das células germinativas, os cortes histológicos de 1 μm foram corados com laranja de acridina e iodeto de propídio. O laranja de acridina cora as células viáveis em verde, o iodeto de propídio cora as células cuja integridade de membrana foi perdida em vermelho, sendo essas células classificadas de acordo com a condensação e fragmentação do núcleo e com a integridade de membrana (Giri & Roy, 2016). Para classificar as células, os núcleos corados em verde são as células viáveis e os núcleos corados de amarelo a vermelho indicam processo de morte celular. As imagens foram feitas em

fotomicroscópio de fluorescência EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canada) e analisadas utilizando-se o software Image-Pro Plus.

Contagem de células no testículo e epidídimo

Foram contados os espermatozoides das regiões cabeça/corpo (C/C) e cauda (C) do epidídimo e as espermátides presentes no testículo que se mostraram resistentes à homogeneização. Os testículos foram pesados, retirada a cápsula albugínea e homogeneizados em 5 mL de NaCl 0,9% (Triton X-100 a 0,05%) por 3 minutos. Posteriormente, foram diluído 5 vezes (1:5) na mesma solução, transferidos para a câmara de Neubauer, e as espermátides resistentes foram contadas. Para o cálculo da produção espermática diária, o número de espermátides por testículo foi dividido por 4,84 (número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero de camundongos) (Robb et al., 1978; Fernandes et al., 2007). A cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram homogeneizados, sendo 200mg da cabeça/corpo e 100 mg da cauda em 1 ml de solução de NaCl a 0,9% (Triton X-100 a 0,05%) por 3 minutos. Em seguida, o homogenato da cabeça/corpo foi diluído 2 vezes (1:2), e o da cauda não passou por uma segunda diluição. Para o cálculo do tempo de trânsito em cada região epididimária em dias, o número total de espermatozoide de cada segmento foi dividido pela produção espermática diária (Robb et al., 1978; Fernandes et al., 2007).

Análise espermática

Para obtenção dos espermatozoides, a região da cauda do epidídimo foi seccionada em uma placa de Petri, utilizando uma lâmina de barbear, em solução Tris-citrato-frutose. Em seguida, 10 µL foram usados para a avaliação da motilidade onde foi calculada a proporção entre espermatozoides imóveis ou móveis em 3 campos aleatórios.

Para análise de integridade de membrana 10 µL de amostra foram adicionados em uma solução de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI) (Harrison & Vickers, 1990). Os espermatozoides foram classificados por possuírem membrana íntegra (CFDA + / PI-) e membrana não íntegra (CFDA-; PI +). Para a contagem foram analisados 200 espermatozoides, em microscópio de epifluorescência (610 nm, Olympus AX70 TRF, Tóquio, Japão), em aumento de 400x.

Histomorfometria Intertubular

A proporção volumétrica dos elementos do intertúbulo foi estabelecida pela contagem de 1000 pontos por animal, em imagens digitais do intertúbulo obtidas dos preparados histológicos. Foi lançada sobre a imagem uma grade com 600 intercessões (pontos), e os pontos incidentes sobre os elementos do tecido conjuntivo, macrófagos, vasos linfáticos, vasos sanguíneos, núcleo e citoplasma de Leydig foram contabilizados. Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula: $\text{Proporção volumétrica (\%)} = (\% \text{ proporção volumétrica de intertúbulo} \times \% \text{ proporção volumétrica do componente no intertúbulo}) / 100$. O volume (mL) dos componentes do intertúbulo nos testículos foi calculado pela equação: $\text{Volume} = \% \text{ do elemento nos testículos} \times \text{PPT} / 100$, onde: PPT= peso do parênquima testicular.

Para o cálculo do diâmetro nuclear da célula de Leydig foram medidos 30 núcleos esféricos, com nucléolo e cromatina perinuclear bem definidos. Foram então calculados os volumes (μm^3) nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e de cada célula de Leydig (VL) através das seguintes equações: $\text{VNL} = 4/3 \pi R^3$, onde R= Raio nuclear; $\text{VCL} = \% \text{ de citoplasma} \times \text{VNL} / \% \text{ de núcleo}$, $\text{VCL} = \text{VNL} + \text{VCL}$.

O volume ocupado pelas células de Leydig por testículo (VLT) foi calculado pela seguinte equação: $\text{VLT} (\mu\text{L}) = \text{Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular} \times \text{Peso do parênquima testicular (PPT)} / 100$. O volume das células de Leydig por grama de testículo (VL/gT) foi obtido pela equação: $\text{VL/gT} = \text{volume ocupado pela célula de Leydig por testículo (VLT)} / \text{peso bruto dos testículos (PT)}$. Os números de células de Leydig por testículo (NLT) e por grama de testículo (NLg/T) foram calculados pelas fórmulas: $\text{NLT} = \text{VLT} (\mu\text{m}^3) / \text{VL} (\mu\text{m}^3)$ e $\text{NLg/T} = \text{NLT} / \text{PT}$.

O índice Leydigossomático (ILS), que determina o percentual de massa corporal alocado em células de Leydig, foi calculado utilizando fórmula: $\text{ILS} = \text{volume que as células de Leydig ocupam nos testículos} / \text{PC} \times 100$, onde PC= peso corporal.

Estresse Oxidativo

Os testículos foram homogeneizados em uma solução tampão fosfato de potássio (pH 7.4), na concentração de 100mg/1000 μL , e centrifugados a 13,8 x g, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA), níveis de proteína total e de enzimas antioxidantes testiculares: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona S-transferase (GST). Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. Todas as atividades

enzimáticas foram determinadas em duplicata usando um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou um leitor ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A atividade de catalase (CAT) foi avaliada de acordo com o método descrito por Aebi (1984). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada nos sobrenadantes conforme o método descrito por Siddiqui et al. (2005) e da glutathione S-transferase (GST) pela formação conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig et al., 1974). Os níveis de malondialdeído (MDA), que é o produto da peroxidação lipídica, foram determinados utilizando-se a solução TBARS (ácido tricloroacético 15% / ácido tiobarbitúrico 0,375% / ácido clorídrico 0,25M). Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados de acordo com Gutteridge e Halliwell (1990). A concentração do óxido nítrico (NO) foi determinada indiretamente através do teor de nitrito/nitrato pela reação de Griess (Ricart-Jané et al., 2002). A proteína total foi mensurada utilizando albumina do soro bovino como curva padrão (Lowry et al., 1951), e utilizada para homogeneização dos dados de estresse oxidativo.

Determinação da capacidade antioxidante total (FRAP)

A capacidade antioxidante total foi estimada de acordo com a capacidade redutora férrica do plasma (FRAP) com o método descrito por Benzie & Strain (1996) usando TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil) -s-triazina) como substrato.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e em seguida feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média.

RESULTADOS

Biometria corporal e testicular

De acordo com os parâmetros biométricos, corporal e testicular, apenas o índice parenquimossomático diminuiu no grupo MAYV quando comparado com o grupo Controle.

Os pesos corporal, testicular, do parênquima e da albugínea, juntamente com o IGS não tiveram diferença significativa (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros biométricos, corporal e testicular, de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV), analisados 42 dias pós-infecção.

	Controle	Dexa	MAYV
PC (g)	35,26 ± 1,66 ^a	37,29 ± 2,46 ^a	37,02 ± 1,66 ^a
PT(g)	0,18±0,01 ^a	0,14 ± 0,05 ^a	0,16 ± 0,03 ^a
PA (g)	0,03 ± 0,02 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^a
PP (g)	0,15 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,04 ^a	0,14 ± 0,03 ^a
IGS (%)	0,51 ± 0,03 ^a	0,37 ± 0,10 ^a	0,47 ± 0,07 ^a
IPS (%)	0,48 ± 0,04 ^a	0,34 ± 0,10 ^a	0,36 ± 0,06 ^b

PC – Peso corporal; PT – Peso testicular; PA – Peso da albugínea; PP – Peso do parênquima testicular; IGS – Índice gonadossomático; IPS – Índice parenquimossomático; Dexa- dexametasona. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamentos e controle, diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Histomorfometria testicular

A microestrutura testicular pode ser observada na Figura 1. Quando comparado ao grupo Controle, a proporção de epitélio diminuiu no MAYV, enquanto a proporção de túnica própria aumentou em todos os grupos. Os percentuais de túbulo e lume se mantiveram dentro da normalidade (Tabela 2).

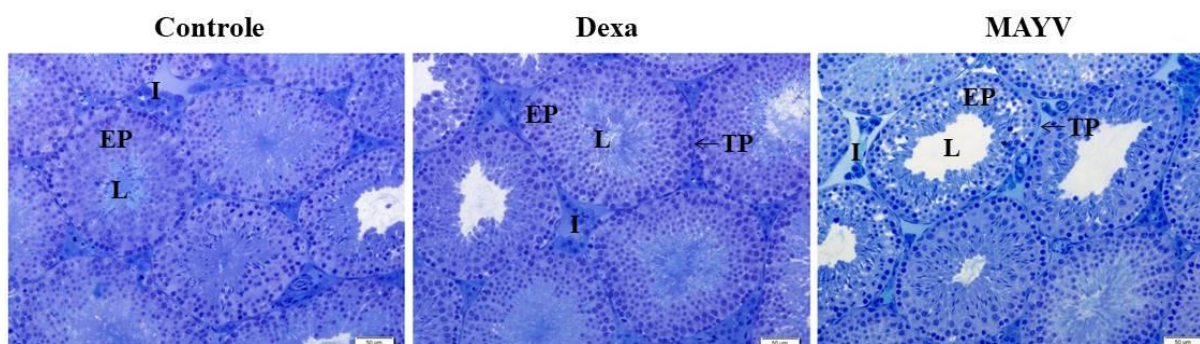


Figura 1: Fotomicrografia do parênquima testicular dos grupos Controle, Dexa (dexametasona) e Mayv (Mayaro vírus). L- Lume; Ep- Epitélio seminífero; I- Intertúbulo; TP- Túnica própria. Corte de 3 µm corados com Azul de toluidina. Barra: 50µm

Tabela 2. Proporção dos componentes tubulares e índices tubulossomático e epiteliossomático, de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

	Controle	Dexa	MAYV
Túbulo seminífero (%)	90,16 ± 2,33 ^a	89,56 ± 1,90 ^a	87,69 ± 1,98 ^a
Epitélio seminífero (%)	69,70 ± 1,22 ^a	66,66 ± 1,24 ^a	64,66 ± 1,85 ^b
Túnica Própria (%)	7,25 ± 0,71 ^a	9,01 ± 0,53 ^b	10,37 ± 0,89 ^b
Lume (%)	13,21 ± 1,73 ^a	13,89 ± 0,55 ^a	12,66 ± 0,44 ^a

Dados expressos como média±DP. Letras diferentes, entre tratamento e controle, diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Na morfometria de túbulo seminífero, não houve alterações significativas em qualquer grupo quando comparado com o grupo Controle (Tabela 3).

Tabela 3. Morfometria de túbulo seminífero de camundongos Balb/c infectados com Mayaro (MAYV).

	Controle	Dexa	MAYV
Diâmetro de Túbulo (μm)	187,30 ± 11,37 ^a	183,19 ± 7,18 ^a	186,78 ± 7,97 ^a
Altura do Epitélio(μm)	57,71 ± 2,27 ^a	55,80 ± 2,31 ^a	58,12 ± 2,23 ^a
Diâmetro do Lume(μm)	71,88 ± 7,42 ^a	71,58 ± 6,72 ^a	70,55 ± 5,64 ^a
CTT/t (m)	4,36 ± 2,32 ^a	4,40 ± 0,74 ^a	4,70 ± 0,45 ^a
CTT/gT (m/g)	23,88 ± 12,65 ^a	32,63 ± 5,13 ^a	29,72 ± 3,47 ^a
Área do túbulo ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$)	27620,00 ± 3377,85 ^a	26444,26 ± 3730,22 ^a	27429,01 ± 2376,88 ^a
Área do lume ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$)	4090,05 ± 833,84 ^a	4050,71 ± 779,04 ^a	3926,93 ± 616,99 ^a
Área do epitélio ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$)	23529,95 ± 2574,25 ^a	22393,55 ± 2985,47 ^a	23502,08 ± 1851,30 ^a
RTE ‘	1,17 ± 0,02 ^a	1,18 ± 0,01 ^a	1,17 ± 0,02 ^a

CTT/t- Comprimento total de túbulo seminífero; CTS/g- Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo e RET – Relação túbulo/Epitélio. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes entre tratamentos e controle, diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Contagem das células no estágio 1

O número de espermátides arredondadas diminuiu no grupo MAYV, assim como o índice meiótico. Por outro lado, o número de células de Sertoli por grama de testículo

aumentou no grupo Dexa. A produção espermática diária por testículo diminuiu no grupo MAYV e a produção espermática diária por grama de testículo foi maior apenas no grupo Dexa (Tabela 4).

Tabela 4. Número corrigido de células no estágio I do ciclo do epitélio seminífero, razões entre os tipos celulares, número de células de Sertoli e produção espermática diária, de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

	Controle	Dexa	MAYV
Espermatogônia	2,17 ± 0,36 ^a	1,68 ± 0,36 ^a	1,66 ± 0,38 ^a
Preleptóteno/ Lentóteno	25,71 ± 1,96 ^a	26,31 ± 4,24 ^a	25,17 ± 2,60 ^a
Paquíteno	30,80 ± 3,02 ^a	29,59 ± 3,78 ^a	28,61 ± 2,58 ^a
Espermátide Arredondada	74,16 ± 6,27 ^a	69,18 ± 8,43 ^a	59,46 ± 5,96 ^b
Sertoli	5,58 ± 0,28 ^a	5,81 ± 0,96 ^a	5,27 ± 0,41 ^a
Índice mitótico	12,16 ± 2,16 ^a	16,03 ± 2,32 ^a	15,92 ± 5,23 ^a
Índice meiótico	2,41 ± 0,09 ^a	2,34 ± 0,22 ^a	2,07 ± 0,04 ^b
Índice de cél. de Sertoli	13,42 ± 1,13 ^a	12,00 ± 1,59 ^a	11,31 ± 1,29 ^a
SER/t	5,84 ± 0,55 ^a	6,22 ± 1,99 ^a	4,80 ± 0,76 ^a
SER/gt	32,07 ± 1,45 ^a	45,16 ± 3,90 ^b	30,60 ± 7,11 ^a
Capacidade Suporte de Sertoli	24,02 ± 1,94 ^a	21,95 ± 2,22 ^a	21,84 ± 2,17 ^a
Rendimento Geral da Espermatogênese	35,04 ± 6,77 ^a	42,61 ± 9,28 ^a	37,61 ± 11,97 ^a
PDE/t	4,11x10 ⁶ ± 6,98x10 ^{5a}	5,03x10 ⁶ ± 1,21x10 ^{6a}	2,77x10 ⁶ ± 7,68x10 ^{5b}
PDE/gt	2,26x10 ⁷ ± 3,45x10 ^{6a}	3,99x10 ⁷ ± 1,97x10 ^{7b}	1,75x10 ⁷ ± 5,66x10 ^{6a}

SER/t – Número de célula de Sertoli por testículo; SER/gt – Número de célula de Sertoli por grama e testículo; PDE/t – Produção espermática diária por testículo; PDE/gt – Produção espermática diária por grama de testículo. Dados expressos como média±DP. letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

Histopatologia testicular

O grupo MAYV apresentou aumento de patologias leves e moderadas quando comparados com o grupo Controle (Figura 2).

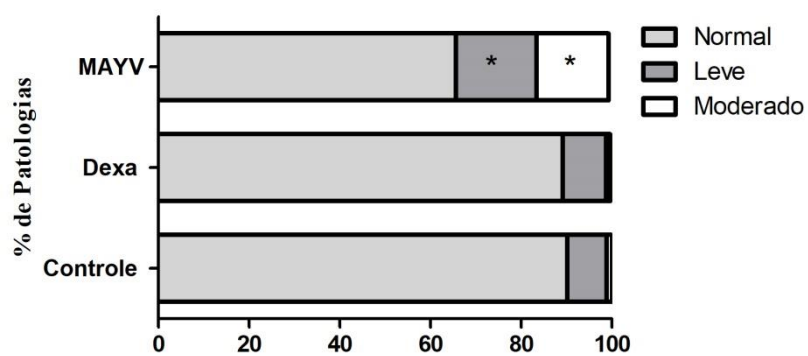


Figura 2: Proporção de túbulos seminíferos patológicos de camundongos Balb/c infectados com MAYV.

Viabilidade das Células Germinativas

Houve aumento de dano celular inicial e morte celular no MAYV, quando comparados com o grupo controle (Figura 3).

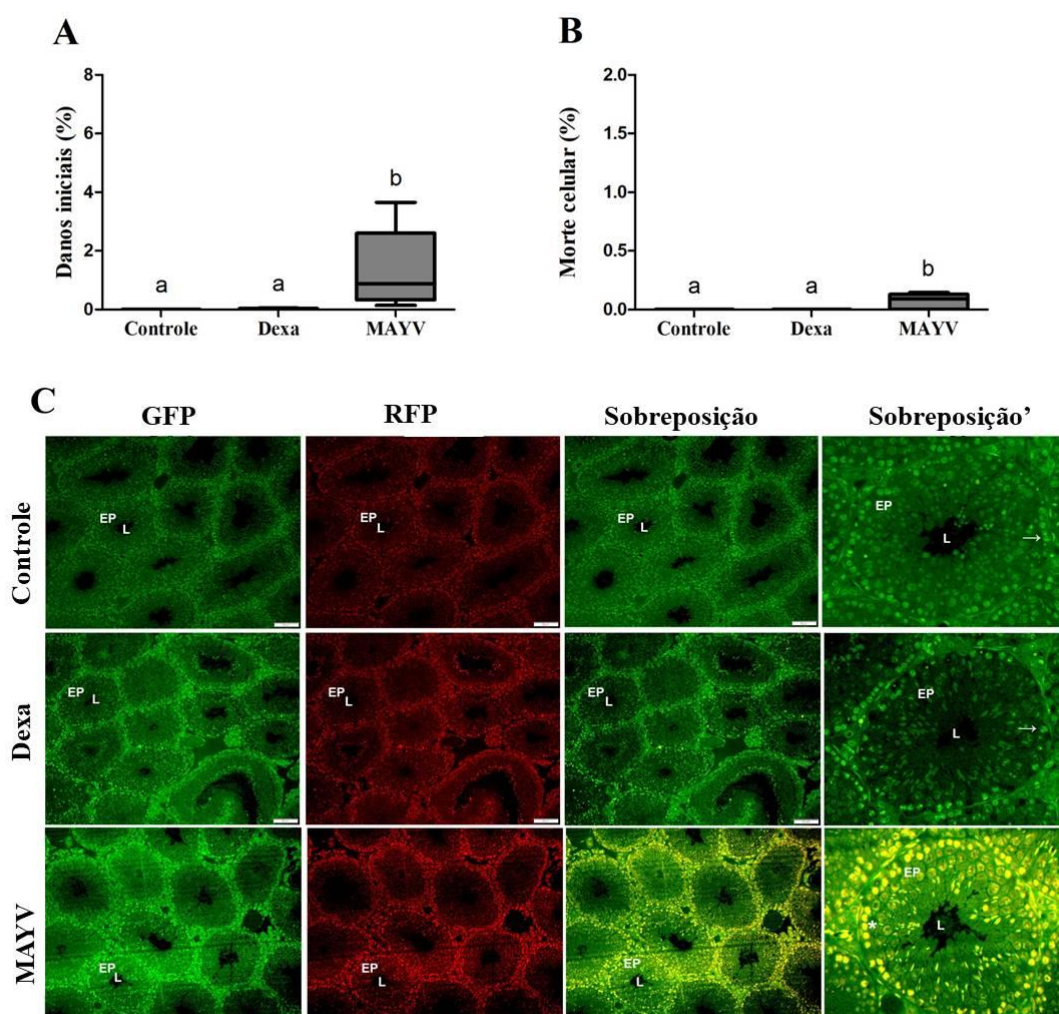


Figura 3: (A) Proporção de células com danos iniciais; (B) Proporção de células em morte celular; (C) Corte histológico de 1 μ m do testículo de camundongos Balb/c infectados MAYV. GFP - filtro 488 nm; RFP - 580 nm; Sobreposição - imagens de sobreposição; Sobreposição' - imagem mesclada ampliada. Ep - epitélio; L - lúmen; \rightarrow - Núcleos verdes - células viáveis; * - Núcleos amarelos - processo de morte celular precoce. Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Barra: 50 μ m

Histomorfometria Intertubular

A microestrutura e composição do intertúbulo podem ser observadas na Figura 4. Os percentuais dos componentes do intertúbulo se apresentaram dentro da normalidade, não havendo alterações nos grupos tratados em comparação ao grupo controle (Tabela 5).

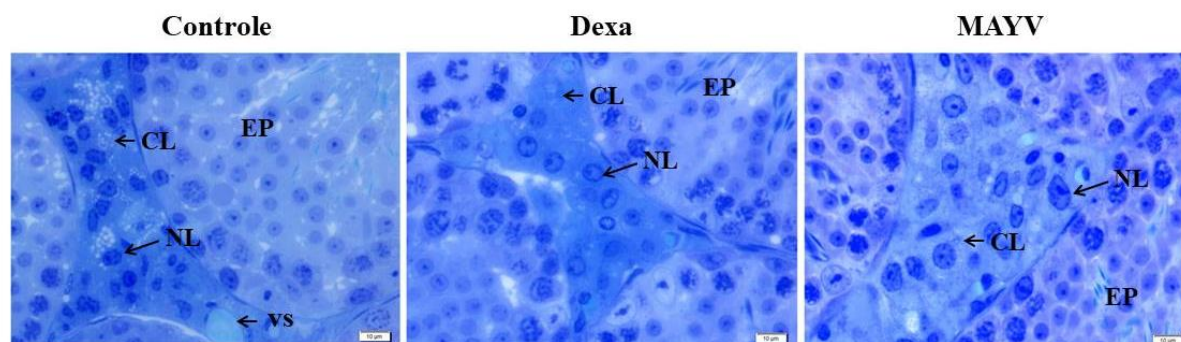


Figura 4: Fotomicrografia da estrutura e composição intertubular dos grupos Controle, Dexa e Mayv. NL- Núcleo de Célula de Leydig; CL- Citoplasma de Célula de Leydig; VS- Vaso sanguíneo; EP-Epitélio seminífero. Corte de 3 µm corados com Azul de toluidina. Barra: 10µm

Tabela 5. Proporção dos componentes do intertúbulo de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

	Controle	Dexa	MAYV
Intertúbulo (%)	9,84 ± 2,33 ^a	10,44 ± 1,90 ^a	12,30 ± 2,00 ^a
Vaso sanguíneo (%)	0,97 ± 0,77 ^a	0,62 ± 0,46 ^a	0,82 ± 0,14 ^a
Espaço Linfático (%)	1,00 ± 0,81 ^a	1,00 ± 0,68 ^a	1,11 ± 0,62 ^a
Núcleo de Leydig (%)	1,00 ± 0,43 ^a	0,14 ± 0,44 ^a	1,50 ± 0,39 ^a
Citoplasma de Leydig (%)	6,51 ± 1,83 ^a	7,43 ± 0,88 ^a	8,67 ± 2,05 ^a
Leydig (%)	7,52 ± 2,21 ^a	8,57 ± 1,26 ^a	10,17 ± 2,43 ^a
Conjuntivo (%)	0,34 ± 0,19 ^a	0,21 ± 0,07 ^a	0,31 ± 0,02 ^a
Macrófago (%)	0,02 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,05 ^a

Dados expressos como média±DP. Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Nos parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig, o diâmetro nuclear e o volume do núcleo de Leydig aumentaram no grupo MAYV (Tabela 6).

Tabela 6: Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

Célula de Leydig	Controle	Dexa	MAYV
Diâmetro Nuclear (μm^3)	6,47 \pm 0,15 ^a	6,42 \pm 0,17 ^a	7,03 \pm 0,14 ^b
Volume do Núcleo (μm^3)	142,19 \pm 10,14 ^a	138,70 \pm 10,75 ^a	182,00 \pm 11,00 ^b
Volume do citoplasma (μm^3)	962,02 \pm 178,98 ^a	983,23 \pm 313,79 ^a	1055,57 \pm 117,13 ^a
Volume da célula (μm^3)	1104,21 \pm 177,35 ^a	1121,93 \pm 324,54 ^a	1237,57 \pm 126,19 ^a
Volume / t ($\times 10^6$)	0,013 \pm 0,004 ^a	0,012 \pm 0,006 ^a	0,015 \pm 0,005 ^a
Volume / gt ($\times 10^6$)	0,07 \pm 0,02 ^a	0,08 \pm 0,01 ^a	0,09 \pm 0,02 ^a
Número / t ($\times 10^6$)	1,20 $\times 10^7$ \pm 6,33 $\times 10^6$ ^a	1,24 $\times 10^7$ \pm 1,02 $\times 10^7$ ^a	1,22 $\times 10^7$ \pm 3,66 $\times 10^6$ ^a
Número / gt ($\times 10^6$)	6,47 $\times 10^7$ \pm 2,89 $\times 10^7$ ^a	7,97 $\times 10^7$ \pm 3,70 $\times 10^7$ ^a	7,62 $\times 10^7$ \pm 1,91 $\times 10^7$ ^a
Índice Leydigossomático (%)	0,04 \pm 0,01 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a	0,04 \pm 0,01 ^a

Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Testosterona

Não houve alterações nos níveis de testosterona nos grupos quando comparados com o grupo controle (Figura 5).

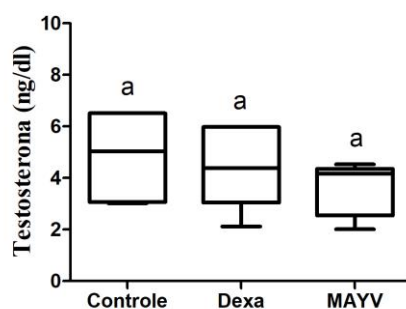


Figura 5: Concentração de testosterona sérica de camundongos Balb/c infectados com MAYV, analisados 42 dias pós-infecção.

Contagem de células no testículo e epidídimo

O número de espermátides por testículo diminuiu nos grupos experimentais quando comparados com o controle, porém, o grupo Dexa aumentou o número de espermátide por grama de testículo. A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo diminuiu no grupo MAYV. O número de espermatozoides no corpo e na cauda do epidídimo, por grama do órgão, também diminuiu no grupo MAYV. O número de espermatozoides na

cauda, por epidídimo e por grama de epidídimo, diminuiu em todos os grupos quando comparado com o grupo controle, sendo que o tempo de trânsito na cauda diminuiu apenas no grupo Dexa (Tabela 7).

Tabela 7: Parâmetros de contagem de células no testículo e epidídimo de camundongos Balb/c infectados com Mayaro vírus (MAYV).

	Controle	Dexa	MAYV
Número de espermátide /t	9,81 ± 0,04 ^a	6,46 ± 1,58 ^b	2,98 ± 0,81 ^b
Número de espermátide /gt	28,31 ± 2,04 ^a	90,45 ± 14,98 ^b	33,08 ± 6,23 ^a
PED/t	1,73 ± 0,52 ^a	1,33 ± 0,33 ^a	0,62 ± 0,17 ^b
PED /gt	17,25 ± 5,32 ^a	13,60 ± 2,04 ^a	5,97 ± 2,14 ^b
Número de espermatozoide CC/Org	3,79 ± 1,83 ^a	3,73 ± 2,10 ^a	1,61 ± 0,33 ^b
Número de espermatozoide CC/gOrg	153,75 ± 31,25 ^a	135,42 ± 64,84 ^a	60,00 ± 5,00 ^b
Tempo de trânsito CC (Dias)	2,11 ± 0,54 ^a	2,77 ± 1,33 ^a	2,74 ± 0,84 ^a
Número de espermatozoide C/Org	5,17 ± 1,45 ^a	2,24 ± 0,19 ^b	1,41 ± 0,38 ^b
Número de espermatozoide na C/gOrg	275,83 ± 60,29 ^a	166,67 ± 37,44 ^b	85,42 ± 15,63 ^b
Tempo de trânsito C (dias)	3,06 ± 0,55 ^a	1,74 ± 0,40 ^b	2,31 ± 0,29 ^a

PED: produção espermática diária. CC: cabeça e corpo do epidídimo. C:Cauda do epidídimo. Dados expressos como média±DP. N = 4 machos/grupo. Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si (p<0,05) (Student Newman Keuls).

Motilidade e integridade de membrana do espermatozoide

A motilidade espermática diminuiu no grupo MAYV, havendo também queda na proporção de espermatozoides com membranas íntegras (Figura 6).

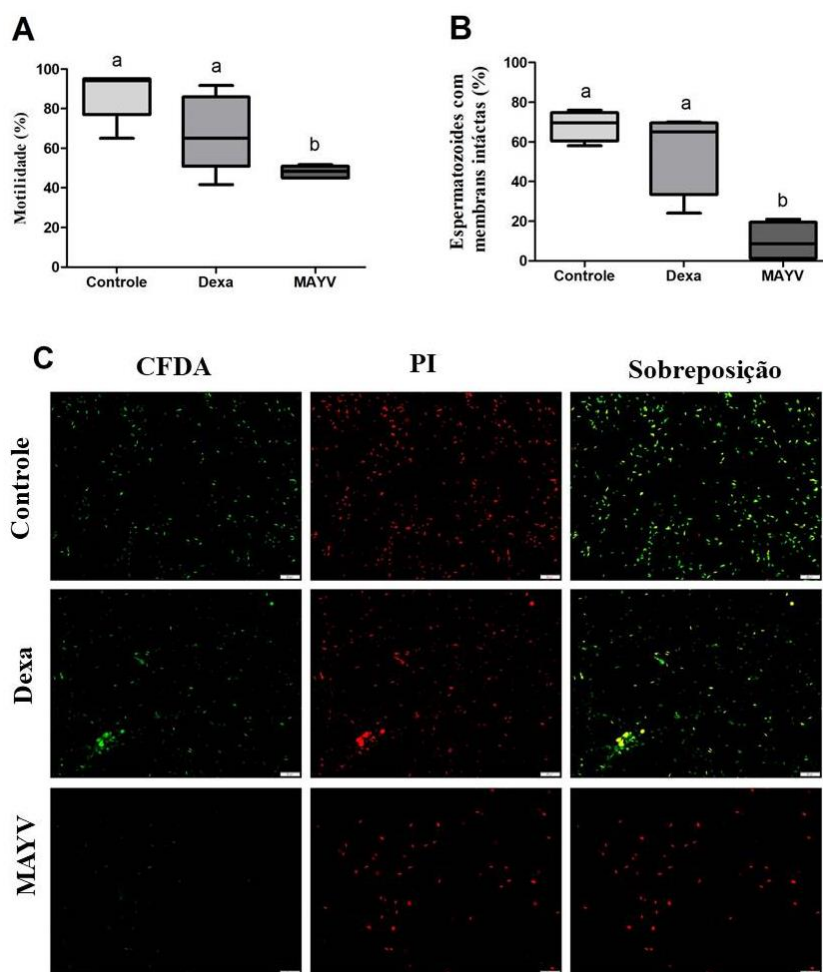


Figura 6: Motilidade espermática (A); Integridade de membrana espermática (B); Membrana acrossômica marcada com diacetato de carboxifluoresceína (CFDA, Verde), o espermatozoide não intacto marcado na cabeça com iodeto de propídio (PI, Vermelho) (C). Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls). Barra= 20 μm .

Estresse Oxidativo do testículo e epidídimo

No testículo, a atividade da SOD se manteve semelhante ao grupo controle em todos os grupos experimentais. A atividade da CAT aumentou nos grupos Dexa e MAYV, enquanto a atividade da GST diminuiu no grupo Dexa. O nível de NO aumentou apenas no grupo MAYV e neste mesmo grupo o nível/concentração de MDA diminuiu. No epidídimo, observou-se aumento da CAT e MDA no grupo MAYV e aumento de NO nos grupo Dexa e MAYV. (Figura 7).

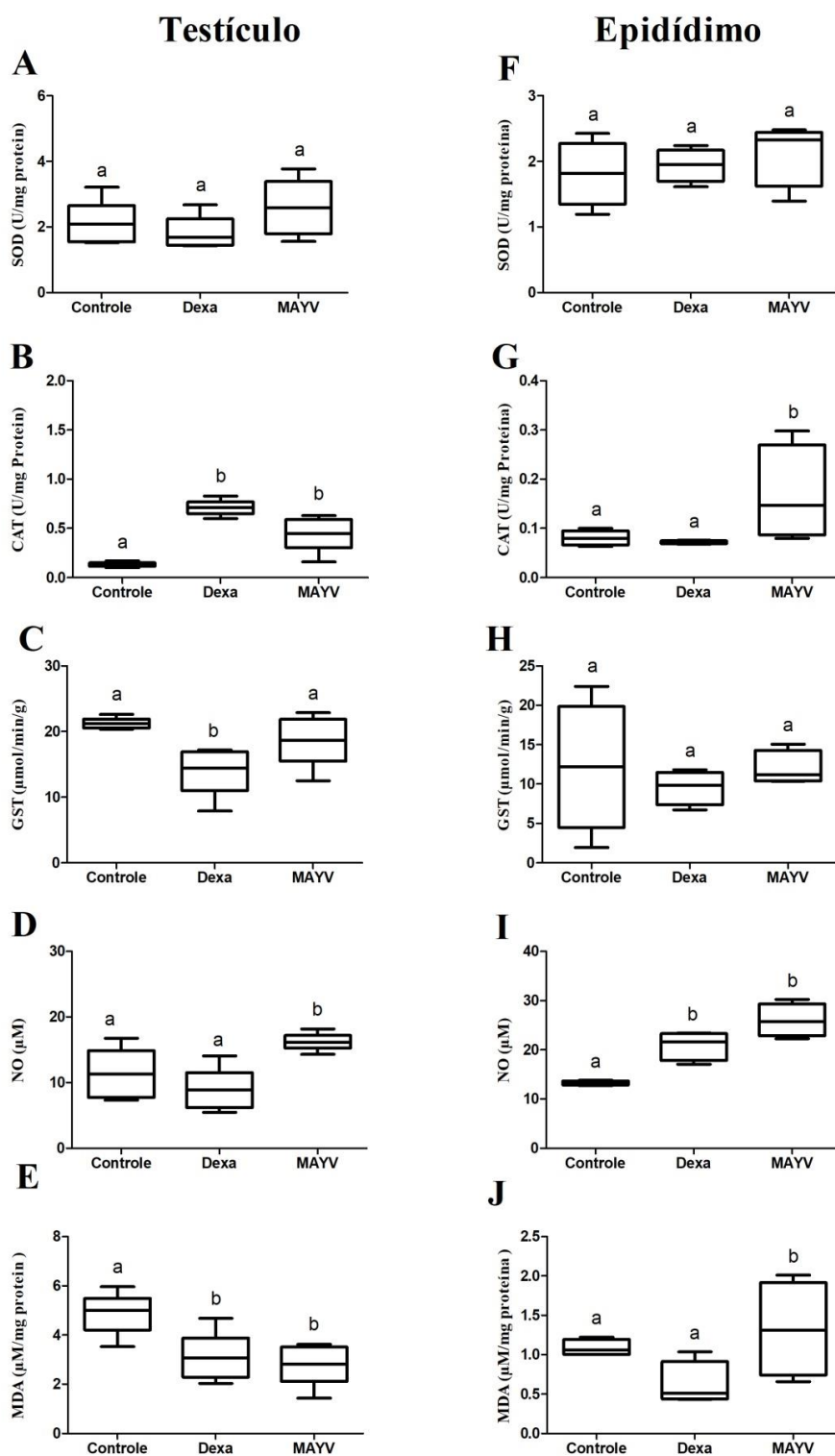


Figura 7: Avaliação do estresse oxidativo e nitrosativo no testículo e epidídimo de camundongos Balb/c infectados com MAYV, 42 dias pós-infecção. Atividade das enzimas antioxidantes no testículo e epidídimo: A e F - Superóxido dismutase (SOD); B e G - Catalase (CAT); C e H - Glutaciona (GTS). Concentrações de D e I - óxido nítrico (ON) e J - malondialdeído (MDA). Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Determinação da capacidade antioxidante total (FRAP)

Foi observado aumento da capacidade antioxidante total do soro nos grupo MAYV quando comparados com o grupo Controle (Figura 8).

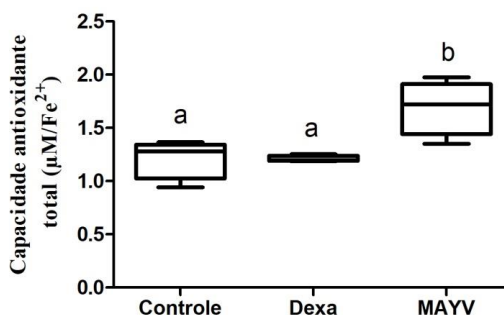


Figura 8: Capacidade antioxidante total do soro de camundongos BALB/c infectados MAYV. Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a interferência do MAYV no sistema reprodutor masculino de camundongos BALB /c 42 dias pós-infecção (dpi). Os dados obtidos confirmam que a infecção causada pelo vírus interfere na microarquitetura testicular e altera os parâmetros espermáticos, com quadro de estresse nitrosativo testicular e estresse oxidativo e nitrosativo epididimário. Embora a doença causada pelo MAYV seja uma doença debilitante por causar febre alta, vômitos, diarreia, erupção cutânea, artralgia, mialgia e cefaleia (Santiago et al., 2015), não causou alterações nos dados biométricos neste trabalho, provavelmente por ter sido analisado 42dpi, tendo passado o período crítico e havendo assim a recuperação dos pesos corporal e testicular, haja vista que camundongos Balb/c infectados com MAYV e analisados 15 e 45 dpi tiveram redução no peso corporal, dos testículos e do parênquima testicular (Dados não publicados).

Embora não tenha ocorrido redução no peso testicular, houve queda na porcentagem de epitélio seminífero nos grupos Dexa e MAYV. No epitélio estão presentes as células da linhagem germinativa, responsáveis por formar os gametas e as células de Sertoli, que dão suporte às espermatogênese (Russel et al., 1990). Qualquer perturbação que ocorra no ambiente do epitélio seminífero pode acarretar alterações na produção espermática (Silva, 2020). A redução epitelial pode ser decorrente do aumento de patologias tubulares e perda celular, o que culmina na redução da produção espermática. Já o aumento do percentual de túnica própria observado nos grupos Dexa e MAYV pode estar relacionado ao aumento da

produção de fibras colágenas, provavelmente estimulada por uma proteoglicana (decorina) envolvida na fibrilogênese em testículos inférteis (Bhide et al., 2005; Orgel et al., 2009; Adam et al., 2011).

Devido à redução epitelial, houve diminuição do número corrigido de espermátides arredondadas no grupo MAYV, e assim, ocorrendo também a redução do índice meiótico, que indica a quantidade de espermátides arredondadas produzidas a partir de espermátócitos primários. Outro reflexo das alterações funcionais é que a produção espermática por testículo foi reduzida no grupo MAYV.

Assim como a redução espermática ocorreu devido à diminuição no número de células germinativas, a viabilidade celular dessas células também ficou comprometida no grupo MAYV, com danos iniciais ao DNA. Como consequência da funcionalidade comprometida das células germinativas, ocorreram alterações histopatológicas no epitélio seminífero de níveis leve e moderado no referido grupo. A histopatologia fornece dados importantes a respeito de desordens celulares testiculares causadas por fatores externos, pois a presença de vacúolos situados entre as células germinativas é capaz de causar deslocamento e desordem no epitélio germinativo. Pode ocorrer também a perda da aderência dos espermátócitos com a célula de Sertoli resultando na descamação do epitélio seminífero para o lúmen do túbulo (Lanning et al., 2002).

A infecção causada pelo MAYV também causou desordens na região intertubular, com o aumento do diâmetro nuclear e volume das células de Leydig. Devido ao processo inflamatório viral, as células de Leydig têm sua funcionalidade modificada (Govero et al., 2016). Mesmo com essas alterações, a testosterona no grupo MAYV não foi alterada significativamente, apresentando queda numérica apenas. MAYV infecta principalmente os macrófagos (De Castro-Jorge et al., 2019), e os macrófagos testiculares possuem interferência direta nas células de Leydig por compartilhar digitações intracitoplasmáticas que os unem fisicamente a tais células (Hutson, 1992).

A relação entre os macrófagos e as células de Leydig é de extrema importância para as funções reprodutivas, pois a interação entre eles mantém o ambiente espermatogênico com interferência direta no desenvolvimento das espermatogônias (Heinrich & DeFalco, 2020). Essa perturbação pode ser vista pela contagem espermática, com redução de espermátides por testículo nos grupos DEXA e MAYV, e redução da produção espermática por testículo e por grama de testículo no grupo MAYV. Já na região da cabeça e do corpo do epidídimo, onde ocorre a maturação dos espermatozoides (Johnson & Varner, 1988), o grupo MAYV

apresentou números reduzidos de espermatozoides resistentes, mas não apresentou atraso no tempo de trânsito. Consequentemente, também se notou números reduzidos de espermatozoides na região da cauda do epidídimo nos grupos Dexa e MAYV, mas apenas o grupo Dexa apresentou número reduzido e tempo de trânsito menor neste segmento. Sendo o tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo acelerado ou retardado, os parâmetros espermáticos serão afetados (Fernandez et al., 2008).

A redução do número de espermatozoides pode estar relacionada com a injúria celular que as doenças virais causam, por produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Ivanov et al., 2017). Tendo em vista que o aumento de EROs pela ação viral causa desordens celulares, os espermatozoides sofreram alterações em sua estrutura e função certamente devido ao estresse oxidativo, pois eles são mais vulneráveis às EROs (Kurkowska et al., 2020). A queda na motilidade espermática no grupo MAYV pode ser devido à ação do H_2O_2 , que danifica o DNA mitocondrial com conseqüente redução na produção de ATP, sendo o mecanismo de motilidade afetado pela menor disponibilidade de energia (Morielli & O'Flaherty, 2015). Número reduzido de espermatozoides com membranas íntegras no grupo MAYV também pode estar relacionado com o aumento de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pois a membrana plasmática contém grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, sendo um local com grande potencial para ocorrer desordens estruturais e funcionais (Bisht et al., 2017). Além disso, o nível elevado de MDA no epidídimo do grupo MAYV contribuiu para as alterações espermáticas, pois é um importante marcador de peroxidação lipídica e altera a função da membrana dos espermatozoides (Janero, 1990; Subramanian et al., 2018). O H_2O_2 é o produto final da catalisação do superóxido (O_2^-) pela enzima SOD, e estando em excesso é altamente prejudicial por gerar o radical hidroxila (OH^\cdot) (Barreiros et al., 2006). A SOD no epidídimo não foi alterada, porém a CAT aumentou no grupo MAYV. A CAT, responsável por decompor H_2O_2 em uma molécula de água e uma de oxigênio (Barreiros et al., 2006), mesmo estando com os níveis elevados, não foi suficiente para estabilizar as altas concentrações de H_2O_2 . Houve também aumento nos níveis de NO no epidídimo nos grupos Dexa e MAYV. A produção excessiva de NO em condições patológicas, como infecções, se torna altamente tóxica para os espermatozoides, com a formação do peroxinitrito, um ânion de peroxidação, podendo reduzir a motilidade e viabilidade espermática (Rosselli et al., 1998).

Na porção testicular, o aumento na atividade de CAT nos grupos Dexa e MAYV mostra que houve aumento de sua atividade para neutralizar os efeitos dos radicais produzidos. A redução de GST no grupo Dexa, indicativo da sua exaustão, pode ter sido

responsável pelo início da desintoxicação de agentes com potencial alquilante (Habig et al., 1974; Barreiros et al., 2006), evidenciando que este sistema de defesa foi eficiente em 42 dias pós-infecção, com diminuição nos níveis de MDA. Por outro lado, a redução dos níveis de MDA no grupo MAYV comprovou que a atividade da CAT foi eficiente para a peroxidação lipídica. Entretanto, o nível de NO aumentou no grupo MAYV, provocando o estresse nitrosativo, sendo altamente tóxico para as células testiculares.

As enzimas antioxidantes foram alteradas nos testículos e epidídimos, mostrando um processo de desintoxicação celular a fim de amenizar os danos causados pela infecção por MAYV. Porém, essa perturbação não ocorreu de modo localizado nos órgãos analisados, pois o FRAP, que é a quantidade total de antioxidante não enzimático circulante (Samudi et al., 2009), apresentou níveis elevados no soro do grupo MAYV, mostrando que a perturbação nas enzimas antioxidantes foi sistêmica.

CONCLUSÕES

Concluimos que o MAYV causou danos ao sistema reprodutor masculino aos 42 dpi, com aumento de patologias tubulares, redução do epitélio seminífero e redução na produção espermática diária. Promoveu também alterações nas células de Leydig com aumento no seu diâmetro e volume. O estresse nitrosativo ocorreu no testículo e epidídimo e o estresse oxidativo no epidídimo, com interferência direta na integridade de membrana e motilidade espermática, causando prejuízo à fertilidade masculina.

REFERÊNCIAS

- Adam, M., Schwarzer, J. U., Khn, F. M., Strauss, L., Poutanen, M., & Mayerhofer, A. (2011). Mast cell tryptase stimulates production of decorin by human testicular peritubular cells: Possible role of decorin in male infertility by interfering with growth factor signaling. *Human Reproduction*, 26(10), 2613–2625.
- Azevedo, R. S. S., Silva, E. V. P., Carvalho, V. L., Rodrigues, S. G., Nunes Neto, J. P., Monteiro, H. A. O., Peixoto, V. S., Chiang, J. O., Nunes, M. R. T., & Vasconcelos, P. F. C. (2009). Mayaro fever virus, Brazilian amazon. *Emerging Infectious Diseases*, 15(11), 1830–1832.
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. (2006). Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quimica Nova*, 29(1), 113–123.
- Bhide, V. M., Laschinger, C. A., Arora, P. D., Lee, W., Hakkinen, L., Larjava, H., Sodek, J., & McCulloch, C. A. (2005). Collagen phagocytosis by fibroblasts is regulated by decorin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 23103–23113.
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., & Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 14(8), 470–485.
- Coimbra, T. L. M., Santos, C. L. S., Suzuki, A., Petrella, S. M. C., Bisordi, I., Nagamori, A. H., Marti, A. T., Santos, R. N., Fialho, D. M., Lavigne, S., Buzzar, M. R., & Rocco, I. M. (2007). Mayaro virus: Imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 49(4), 221–224.
- De Castro-Jorge, L. A., De Carvalho, R. V. H., Klein, T. M., Hiroki, C. H., Lopes, A. H., Guimarães, R. M., Fumagalli, M. J., Floriano, V. G., Agostinho, M. R., Silhessarenko, R. D., Ramalho, F. S., Cunha, T. M., Cunha, F. Q., Da Fonseca, B. A. L., & Zamboni, D. S. (2019). The NLRP3 inflammasome is involved with the pathogenesis of Mayaro virus. *PLoS Pathogens*, 15(9), 1–27.
- Fernandez, C. D. B., Porto, E. M., Arena, A. C., & De Kempinas, W. G. (2008). Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International Journal of Andrology*, 31(4), 427–437.
- Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S. M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D. J., Gorman, M. J., Richner, J. M., Caine, E. A., Salazar, V., Moley, K. H., & Diamond, M. S. (2016). Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*, 540(7633), 438–442.

- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139.
- Halsey, E. S., Siles, C., Guevara, C., Vilcarromero, S., Jhonston, E. J., Ramal, C., Aguilar, P. V., & Ampuero, J. S. (2013). Mayaro virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010–2013. *Emerging Infectious Diseases*, 19(11), 1839–1842.
- Heinrich, A., & DeFalco, T. (2020). Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology*, 8(4), 903–914.
- Hutson, J. C. (1992). Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell and Tissue Research*, 267(2), 385–389.
- Ivanov, A. V., Bartosch, B., & Isagulians, M. G. (2017). Oxidative stress in infection and consequent disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 10–13.
- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 515–540.
- Johnson, L., & Varner, D. D. (1988). Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biology of Reproduction*, 39(4), 812–817.
- Kurkowska, W., Bogacz, A., Janiszewska, M., Gabryś, E., Tiszler, M., Bellanti, F., Kasperczyk, S., Machoń-Grecka, A., Dobrakowski, M., & Kasperczyk, A. (2020). Oxidative Stress is Associated with Reduced Sperm Motility in Normal Semen. *American Journal of Men's Health*, 14(5).
- Lanning, L. L., Creasy, D. M., Chapin, R. E., Mann, P. C., Barlow, N. J., Regan, K. S., & Goodman, D. G. (2002). Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30(4), 507–520.
- Lopes, N., Nozawa, C., & Linhares, R. E. C. (2014). Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 5(3), 55–64.
- Mayer, S. V., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Tropica*, 166, 155–163.
- Morielli, T., & O'Flaherty, C. (2015). Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. *Reproduction*, 149(1), 113–123.
- Mota, M. T., Ribeiro, M. R., Vedovello, D., & Nogueira, M. L. (2015). Mayaro virus: A

- neglected arbovirus of the Americas. *Future Virology*, 10(9), 1109–1122.
- Orgel, J. P. R. O., Eid, A., Antipova, O., Bella, J., & Scott, J. E. (2009). Decorin core protein (decoron) shape complements collagen fibril surface structure and mediates its binding. *PLoS ONE*, 4(9).
- Puggioni, G., Pintus, D., Melzi, E., Meloni, G., Rocchigiani, A. M., Maestrale, C., Manunta, D., Savini, G., Dattena, M., Oggiano, A., Palmarini, M., & Ligios, C. (2018). Testicular Degeneration and Infertility following Arbovirus Infection. *Journal of Virology*, 92(19), 1–17.
- Rosselli, M., Keller, P. J., & Dubey, R. K. (1998). Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update*, 4(1), 3–24.
- Russell, L., Ettlín, R., HIKIM, A.S., CLEGG, E (1990). Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, L.; ETTLIN, R.; SINHA HIKIM, A; CLEGG, E. (Eds.). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Florida. [s.n.]; 1–40
- Samudi, C., Govind, S. K., Bustam, A. Z., & Kuppusamy, U. R. (2009). Attenuation of hydrogen peroxide and ferric reducing/antioxidant power serum levels in colorectal cancer patients with intestinal parasitic infection. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 16(2), 15–20.
- Santiago, F. W., Halsey, E. S., Siles, C., Vilcarrómero, S., Guevara, C., Silvas, J. A., Ramal, C., Ampuero, J. S., & Aguilar, P. V. (2015). Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), 1–14.
- Silva, A. A. (2020). A infecção pelo vírus ZIKA causa alterações morfológicas testiculares e espermáticas em camundongos BALB/C adultos. Universidade Federal de Pernambuco. p.74. (Dissertação, metrado)
- Subramanian, V., Ravichandran, A., Thiagarajan, N., Govindarajan, M., Dhandayuthapani, S., & Suresh, S. (2018). Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 45(2), 88–93.
- Tesh, R. B., Watts, D. M., Russell, K. L., Damodaran, C., Calampa, C., Cabezas, C., Ramirez, G., Vasquez, B., Hayes, C. G., Rossi, C. A., Powers, A. M., Hice, C. L., Chandler, L. J., Cropp, B. C., Karabatsos, N., Roehrig, J. T., & Gubler, D. J. (1999). Mayaro virus disease: An emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. *Clinical*

Infectious Diseases, 28(1), 67–73.

Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2), 328–345.

Wiszniewska, B., Kurzawa, R., Ciechanowicz, A., Machalinski, B. (1997). Inducible nitric oxide synthase in the epithelial epididymal cells of the rat. *Reproduction, Fertility, and Development*. 9(8), 789-794

Wu, H., Jiang, X., Gao, Y., Liu, W., Wang, F., Gong, M., Chen, R., Yu, X., Zhang, W., Gao, B., Song, C., & Han, D. (2019). Mumps virus infection disrupts blood-testis barrier through the induction of TNF- α in Sertoli cells. *FASEB Journal*, 33(11), 12528–12540.

CAPÍTULO 4:**A infecção por ZIKV altera parâmetros espermáticos de camundongos
Balb/c adultos**

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV), pertencente à família *Flaviviridae*, é transmitido por intermédio de artrópodes, como o mosquito *Aedes aegypti*, e tem os humanos como reservatório temporário. Além da transmissão pelo mosquito, também há transmissão por transfusão sanguínea, durante a gravidez de mãe para filho (transmissão vertical), ou por ato sexual (Masmajan et al., 2020). O ZIKV possui tropismo pelos testículos e epidídimos, e o ambiente imunoprivilegiado que os testículos possuem faz com que o ZIKV persista caso haja sua entrada nos túbulos seminíferos, estabelecendo um reservatório viral. Neste contexto, avaliamos os efeitos da infecção pelo ZIKV no sistema reprodutor masculino de camundongos Balb/c adultos infectados pela via direta. Vinte e quatro camundongos foram divididos em três grupos experimentais (n=8/grupo), sendo: Grupo Controle, Grupo Dexa (fosfato de dexametasona) e Grupo infectado com ZIKV, analisados aos 42 dpi. Observou-se redução na porcentagem de epitélio seminífero e túnica própria e redução no comprimento de túbulo por testículo no grupo ZIKV. Houve aumento no número de células de Sertoli e na produção espermática no grupo Dexa, e redução da produção espermática por testículo no grupo ZIKV. Foram encontrados histopatologias, danos iniciais e morte celular no grupo ZIKV. Houve redução no número de espermátides por testículo nos grupos Dexa e ZIKV, e aumento no número de espermátides por grama de testículo no grupo Dexa. A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo reduziu no grupo ZIKV, bem como o número de espermatozoides na cabeça e no corpo do epidídimo, mas houve aumento no tempo de trânsito nestas regiões. Na região da cauda do epidídimo, o número de espermatozoides reduziu nos grupos Dexa e ZIKV, sendo o tempo de trânsito reduzido apenas no grupo Dexa. Houve redução da motilidade e integridade de membrana dos espermatozoides no grupo ZIKV. No testículo observou-se aumento da atividade da enzima catalase (CAT) no grupo Dexa, redução na atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) nos grupos Dexa e ZIKV e redução nos níveis de malondialdeído (MDA) apenas no grupo Dexa. No epidídimo, houve aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD) e nos níveis de óxido nítrico (NO) e MDA no grupo ZIKV. O FRAP no soro reduziu apenas no grupo ZIKV. Os resultados indicam que o ZIKV, 42 dpi, tem interferência direta nas células dos túbulos seminíferos e espermatozoides, e causa estresse oxidativo e nitrosativo epididimário.

INTRODUÇÃO

As infecções virais estão abrindo novos caminhos para a compreensão da interação direta dos vírus com o sistema imunológico celular (Weidner et al., 2013). Foi identificado um grande número de famílias virais com potencial de prejudicar a fertilidade masculina e que são transmitidos sexualmente, como o Zika vírus (ZIKV) (Govero et al., 2016; Liu et al., 2018). O ZIKV foi encontrado no sêmen de homens infectados e o RNA persistiu por mais tempo no sêmen do que no sangue, indicando que o sistema reprodutor masculino pode auxiliar na replicação viral (Mansuy et al., 2016; Mead et al., 2018).

O ZIKV, pertencente à família *Flaviviridae*, é transmitido por intermédio de artrópodes a animais vertebrados, e tem os humanos como reservatório temporário (Enfissi et al., 2016). A infecção pode causar sintomas como febre baixa, artralgia, mialgia, cefaleia, dor abdominal, dor retro-orbitária, erupções cutâneas e conjuntivite (Marano et al., 2016). O vírus pode ser transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*, transfusão sanguínea, durante a gravidez de mãe para filho (vertical), ou por ato sexual (Masmajan et al., 2020). O ZIKV possui tropismo pelos testículos e epidídimos, e o ambiente imunoprivilegiado que os testículos possuem faz com que o ZIKV persista caso haja a entrada nos túbulos seminíferos e estabeleça um reservatório viral (Musso et al., 2015; Govero et al., 2016; Ma et al., 2016).

Uma vez que o ZIKV infecta o trato genital masculino, as células de Sertoli, espermatogônias e espermátides se tornam alvos para a replicação (Govero et al., 2016). O mecanismo usado pelo ZIKV para infectar uma célula depende da disponibilidade do receptor da família Axl TAM (Tyro3, Axl e Mer), presente em células de Sertoli e de Leydig, sendo menos expresso na última. As células de Sertoli são responsáveis por manter o ambiente imunoprivilegiado do testículo através da barreira hematotesticular, e suportam bem a replicação viral, embora tenham a sua fisiologia modificada (Kumar et al., 2018; Lemke & Rothlin, 2008). O ZIKV altera este ambiente por meio dos macrófagos infectados, com a produção de mediadores inflamatórios responsáveis pelo rompimento dessa barreira (Govero et al., 2016; Siemann et al., 2017).

Neste contexto, avaliamos os efeitos da infecção por ZIKV 42 dias pós-infecção nos testículos e epidídimos de camundongos Balb/c adultos infectados por via direta, e como esta infecção afeta o funcionamento do sistema reprodutor masculino.

MATERIAL E MÉTODOS

Estoque e título viral

A cepa do vírus Zika (ZIKV PE243) foi propagada utilizando-se células vero, cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) em garrafas de 75 cm² a 28°C. O título viral foi determinado pelo método TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose) em placas de 96 poços, sendo mantidas a 37°C e 5% CO₂ até atingirem cerca de 80% de confluência. O título viral foi expresso em Unidades Formadoras de Placa por mililitro (PFU/mL).

Grupos experimentais

O experimento seguiu as normas determinadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (protocolo 70/2019). Vinte e quatro camundongos machos Balb/c adultos (36g; 60 dias de idade) foram divididos em 3 grupos experimentais (n=8/grupo), sendo: Grupo Controle, Grupo Dexa (fosfato de dexametasona) e Grupo infectado com ZIKV. Os animais de cada grupo foram alojados em gaiolas coletivas e eutanasiados aos 42 dias pós-infecção.

Os animais infectados receberam o fosfato de dexametasona (35mg/kg) 3 dias antes da infecção, no 4º dia foram infectados via intraperitoneal (IP). Foram inoculados na região intraperitoneal 200µl de ZIKV na concentração de 1x10⁴ PFU. Receberam o fosfato de dexametasona por mais 9 dias pós infecção, a fim de reduzir a resposta imune do animal e ocorrer a infecção. O grupo Controle recebeu o meio de cultura na região intraperitoneal no 4º dia para simular o estresse da infecção e o grupo dexametasona recebeu apenas a dexametasona e no dia da infecção receberam apenas meio de cultura.

Coleta do material biológico

Os animais de cada grupo foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte), anestesiados com tiopental (i.p., 30mg/kg) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado e centrifugado a 4.119G por 15 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado em microtubos e congelado a -80°C. Os testículos foram retirados, dissecados e pesados, sendo 6 testículos direitos fixados em Karnovsky (glutaraldeído 4% e paraformaldeído 4%, tampão...pH) para análises histológicas e 6 testículos esquerdos

congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer (-80°C) para análises de estresse oxidativo. Para a análise de trânsito espermático, 4 testículos e epidídimos foram armazenados a -20°C, e 5 epidídimos foram utilizados para análise de motilidade espermática e integridade de membrana.

Microscopia de luz

Fragmentos do testículo foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica). Secções de 3µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica), respeitando-se intervalos de 39 µm entre os cortes, que foram corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%. Imagens digitais foram obtidas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX - 53, Tokyo, Japan) equipado com câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan) e a morfometria foi realizada através do software Image J (National Institute of Health, USA).

Biometria corporal e testicular

Depois de fixado, o testículo foi pesado, a albugínea retirada e pesada, descontando seu peso do testículo inteiro. Com o peso corporal e testicular foi calculado então o índice gonadossomático (IGS), que representa o percentual de peso corporal alocado em gônadas, a partir da fórmula:

$$\text{IGS (\%)} = \frac{\text{Peso total das gônadas}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

Através do peso do parênquima testicular (peso testicular – peso da albugínea) e do peso corporal foi calculado o índice parenquimossomático (IPS) através da equação:

$$\text{IPS (\%)} = \frac{\text{Peso do parênquima dos dois testículos}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

Proporção de túbulos seminíferos em formação

Para a proporção de túbulos seminíferos em formação foram contabilizados 200 túbulos dos animais 15 dpi analisados, sendo os túbulos classificados da seguinte forma: com lume e sem lume.

Histomorfometria testicular

A proporção volumétrica dos componentes dos túbulos seminíferos foi calculada a partir de uma grade com 266 intercessões (pontos), em 10 campos aleatórios, totalizando 2660 pontos por animal. Foram contabilizados pontos sobre a túnica própria, epitélio seminífero, lúmen e intertúbulo. Para calcular a proporção volumétrica dos componentes testiculares foi utilizada a seguinte fórmula: Proporção volumétrica (%) = $(NT / NTT) \times 100$, onde NT= Registro do número de pontos contados sobre o componente e NTT= Número de pontos totais contados.

O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado considerando o percentual ocupado por cada constituinte multiplicado pelo volume do parênquima testicular. Para o diâmetro tubular médio, foram medidos, aleatoriamente, 20 túbulos seminíferos que apresentavam forma mais circular possível. Para a altura do epitélio seminífero, a mensuração se deu pela distância da túnica própria até o lúmen, em duas medidas diametralmente opostas, utilizando-se as mesmas secções transversais usadas para medir o diâmetro tubular.

Para os cálculos das áreas tubular (ART), luminal (ARL) e epitelial (ARE) foram utilizadas as seguintes equações: $ART = \pi \cdot RT^2$ (RT= raio tubular); $ARL = \pi \cdot RL^2$ (RL= raio luminal); $ArE = ArT - ArLU$ e a Relação T/E= ArT/ArE . O comprimento total dos túbulos seminíferos, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos mesmos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal (Dorst & Sajonski, 1974). O comprimento total de túbulo por grama de testículo foi calculado a partir da fórmula: $CTT/g = \text{Comprimento total de túbulos} / \text{Peso bruto dos testículos (g)}$.

Contagem das células no estágio 1

As células germinativas tais como espermatogônias do tipo A (A), espermatócitos primários em preleptóteno / leptóteno (PL / L), espermatócitos primários em paquíteno (P), espermatídes arredondadas (RS) e as células de Sertoli (S), foram quantificadas em secções transversais de 20 túbulos seminíferos no estágio I por animal. Foram medidos os diâmetros de 30 núcleos das células germinativas e de 30 nucléolos das células de Sertoli. Os resultados foram corrigidos de acordo com as variações do tamanho das células e espessura do corte pela seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}}$$

DM= diâmetro nuclear (nucleolar) médio.

Para avaliar a eficiência do processo espermatogênico e das células de Sertoli, foram estimadas razões a partir dos números corrigidos das células germinativas e de Sertoli (Dias et al., 2019). As seguintes razões foram utilizadas: coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL/L:SGA); rendimento geral da espermatogênese (EAR: SGA); índice meiótico (EAR:PAQ); índice de célula de Sertoli (EAR: SER); capacidade total de suporte da célula de Sertoli (SGA + PL/L + PAQ + EAR:SER).

O número de células de Sertoli foi estimado a partir do número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio I e do comprimento total de túbulos seminíferos segundo a fórmula:

$$NCS = \frac{CTS (\mu\text{m}) \times N^{\circ} \text{ corrigido de nucléolos de cel. de Sertoli por secção transversal}}{\text{Espessura do corte } (\mu\text{m})}$$

CTS= Comprimento total de túbulos seminíferos (μm).

A partir desse cálculo, foi estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo. A produção espermática diária (PED) foi calculada segundo AMANN e ALMQUIST (1961), de acordo com a fórmula:

$PED = \text{Volume de túbulo seminífero } (\mu\text{m}^3) \times \text{Número corrigido de espermátides arredondadas} / \text{Duração do ciclo do epitélio seminífero (dias)} \times \text{Área da secção transversal do túbulo seminífero no estágio 1 } (\mu\text{m}^2) \times \text{espessura do corte histológico } (\mu\text{m}).$

Os valores por grama de testículo foram estimados dividindo a PDE pelo peso testicular.

Histopatologia testicular

Foram utilizados 200 túbulos seminíferos analisados aleatoriamente, por animal. As alterações patológicas existentes nos testículos foram classificadas utilizando-se o score descrito por Johnsen (1970), modificado para 8 níveis (Dias et al., 2019): Nível 1- túbulos íntegros, com células germinativas dispostas no seu sítio de localização normal e poucos vacúolos; Nível 2- vacúolos na base do epitélio; Nível 3- vacúolos no ápice do epitélio; Nível 4- vacúolos na base e no ápice do epitélio; Nível 5- células germinativas no interior do lúmen e presença de células em processo de degeneração; Nível 6- epitélio apenas com células basais; Nível 7- epitélios apenas com células de Sertoli; Nível 8- túbulos seminíferos desprovidos de células de Sertoli ou germinativas. Os níveis foram agrupados como: normais (nível 1), com patologias leves (níveis 2 e 3), com patologias moderadas (níveis 4 e 5) e com patologias severas (níveis 6, 7 e 8).

Viabilidade das Células Germinativas

Para análise da viabilidade das células germinativas, os cortes histológicos de 1µm foram corados com laranja de acridina e iodeto de propídio. O laranja de acridina cora as células viáveis em verde, o iodeto de propídio cora as células cuja integridade de membrana foi perdida em vermelho, sendo essas células classificadas de acordo com a condensação e fragmentação do núcleo e com a integridade de membrana (Giri & Roy, 2016). Para classificar as células, os núcleos corados em verde são as células viáveis e os núcleos corados de amarelo a vermelho indicam processo de morte celular. As imagens foram feitas em fotomicroscópio de fluorescência EVOS fl (Life Technologies, Carlsbad, Canada) e analisadas utilizando-se o software Image-Pro Plus.

Contagem de células no testículo e epidídimo

Foram contados os espermatozoides das regiões cabeça/corpo (C/C) e cauda (C) do epidídimo e as espermátides presentes no testículo que se mostraram resistentes à homogeneização. Os testículos foram pesados, retirada a cápsula albugínea e homogeneizados em 5 mL de NaCl 0,9% (Triton X-100 a 0,05%) por 3 minutos. Posteriormente, foram diluído 5 vezes (1:5) na mesma solução, transferidos para a câmara de Neubauer, e as espermátides resistentes foram contadas. Para o cálculo da produção espermática diária, o número de espermátides por testículo foi dividido por 4,84 (número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero de camundongos) (Robb et al., 1978; Fernandes et al., 2007). A cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram homogeneizados, sendo

200mg da cabeça/corpo e 100 mg da cauda em 1 ml de solução de NaCl a 0,9% (Triton X-100 a 0,05%) por 3 minutos. Em seguida, o homogenato da cabeça/corpo foi diluído 2 vezes (1:2), e o da cauda não passou por uma segunda diluição. Para o cálculo do tempo de trânsito em cada região epididimária em dias, o número total de espermatozoide de cada segmento foi dividido pela produção espermática diária (Robb et al., 1978; Fernandes et al., 2007).

Análise espermática

Para obtenção dos espermatozoides, a região da cauda do epidídimo foi seccionada em uma placa de Petri, utilizando uma lâmina de barbear, em solução Tris-citrato-frutose. Em seguida, 10 µL foram usados para a avaliação da motilidade onde foi calculada a proporção entre espermatozoides imóveis ou móveis em 3 campos aleatórios.

Para análise de integridade de membrana 10 µL de amostra foram adicionados em uma solução de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI) (Harrison & Vickers, 1990). Os espermatozoides foram classificados por possuírem membrana íntegra (CFDA + / PI-) e membrana não íntegra (CFDA-; PI +). Para a contagem foram analisados 200 espermatozoides, em microscópio de epifluorescência (610 nm, Olympus AX70 TRF, Tóquio, Japão), em aumento de 400x.

Histomorfometria Intertubular

A proporção volumétrica dos elementos do intertúbulo foi estabelecida pela contagem de 1000 pontos por animal, em imagens digitais do intertúbulo obtidas dos preparados histológicos. Foi lançada sobre a imagem uma grade com 600 intercessões (pontos), e os pontos incidentes sobre os elementos do tecido conjuntivo, macrófagos, vasos linfáticos, vasos sanguíneos, núcleo e citoplasma de Leydig foram contabilizados. Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula: Proporção volumétrica (%) = (% proporção volumétrica de intertúbulo x % proporção volumétrica do componente no intertúbulo) / 100. O volume (mL) dos componentes do intertúbulo nos testículos foi calculado pela equação: Volume = % do elemento nos testículos x PPT / 100, onde: PPT= peso do parênquima testicular.

Para o cálculo do diâmetro nuclear da célula de Leydig foram medidos 30 núcleos esféricos, com nucléolo e cromatina perinuclear bem definidos. Foram então calculados os volumes (µm³) nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e de cada célula de Leydig (VL) através das seguintes equações: $VNL = 4/3 \pi R^3$, onde R= Raio nuclear; $VCL = \% \text{ de citoplasma} \times VNL / \% \text{ de núcleo}$, $VCL = VNL + VCL$.

O volume ocupado pelas células de Leydig por testículo (VLT) foi calculado pela seguinte equação: $VLT (\mu L) = \text{Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular} \times \text{Peso do parênquima testicular (PPT)} / 100$. O volume das células de Leydig por grama de testículo (VL/gT) foi obtido pela equação: $(VL/gT) = \text{volume ocupado pela célula de Leydig por testículo (VLT)} / \text{peso bruto dos testículos (PT)}$. Os números de células de Leydig por testículo (NLT) e por grama de testículo (NLg/T) foram calculados pelas fórmulas: $NLT = VLT (\mu m^3) / VL (\mu m^3)$ e $NLg/T = NLT / PT$.

O índice Leydigossomático (ILS), que determina o percentual de massa corporal alocado em células de Leydig, foi calculado utilizando fórmula: $ILS = \text{volume que as células de Leydig ocupam nos testículos} / PC \times 100$, onde PC=peso corporal.

Estresse Oxidativo

Os testículos foram homogeneizados em uma solução tampão fosfato de potássio - molaridade (pH 7,4), na concentração de 100mg/1000 μ L, e centrifugados a 13,8 x g, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA), níveis de proteína total e de enzimas antioxidantes testiculares: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST). Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas em duplicata usando um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou um leitor ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

A atividade de catalase (CAT) foi avaliada de acordo com o método descrito por Aebi (1984). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada nos sobrenadantes conforme o método descrito por Siddiqui et al. (2005) e da glutathione S-transferase (GST) pela formação conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig et al., 1974). Os níveis de malondialdeído (MDA), que é o produto da peroxidação lipídica, foram determinados utilizando-se a solução TBARS (ácido tricloroacético 15% / ácido tiobarbitúrico 0,375% / ácido clorídrico 0,25M). Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados de acordo com Gutteridge e Halliwell (1990). A concentração do óxido nítrico (NO) foi determinada indiretamente através do teor de nitrito/nitrato pela reação de Griess (Ricart-Jané et al., 2002). A proteína total foi mensurada utilizando albumina do soro bovino como curva padrão (Lowry et al., 1951), e utilizada para homogeneização dos dados de estresse oxidativo.

Determinação da capacidade antioxidante total (FRAP)

A capacidade antioxidante total foi estimada de acordo com a capacidade redutora férrica do plasma (FRAP) com o método descrito por Benzie & Strain (1996) usando TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil) -s-triazina) como substrato.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à avaliação de normalidade pelo teste de ShapiroWilk e em seguida feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, sendo o nível de significância considerado de $p \leq 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média.

RESULTADOS

Biometria corporal e testicular

Não houve diferenças significativas comparado com o grupo controle em qualquer parâmetro biométrico, corporal e testicular.

Tabela 1. Parâmetros biométricos, corporal e testicular, de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

	Controle	Dexa	ZIKV
PC (g)	35,26 \pm 1,66 ^a	37,29 \pm 2,46 ^a	39,49 \pm 3,04 ^a
PT(g)	0,18 \pm 0,01 ^a	0,14 \pm 0,05 ^a	0,22 \pm 0,03 ^a
PA (g)	0,03 \pm 0,02 ^a	0,01 \pm 0,01 ^a	0,01 \pm 0,003 ^a
PP (g)	0,15 \pm 0,02 ^a	0,13 \pm 0,04 ^a	0,21 \pm 0,03 ^a
IGS (%)	0,51 \pm 0,03 ^a	0,37 \pm 0,10 ^a	0,56 \pm 0,05 ^a
IPS (%)	0,48 \pm 0,04 ^a	0,34 \pm 0,10 ^a	0,48 \pm 0,08 ^a

PC – Peso corporal; PT – Peso testicular; PA – Peso da albugínea; PP – Peso do parênquima testicular; IGS – Índice gonadossomático; IPS – Índice parenquimossomático; Dexa - dexametasona. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Histomorfometria testicular

A microestrutura testicular pode ser observada na Figura 1. O percentual de epitélio diminuiu no grupo ZIKV, enquanto o percentual de túnica própria aumentou em todos os grupos, sendo todos os valores comparados com o grupo Controle (Tabela 2).

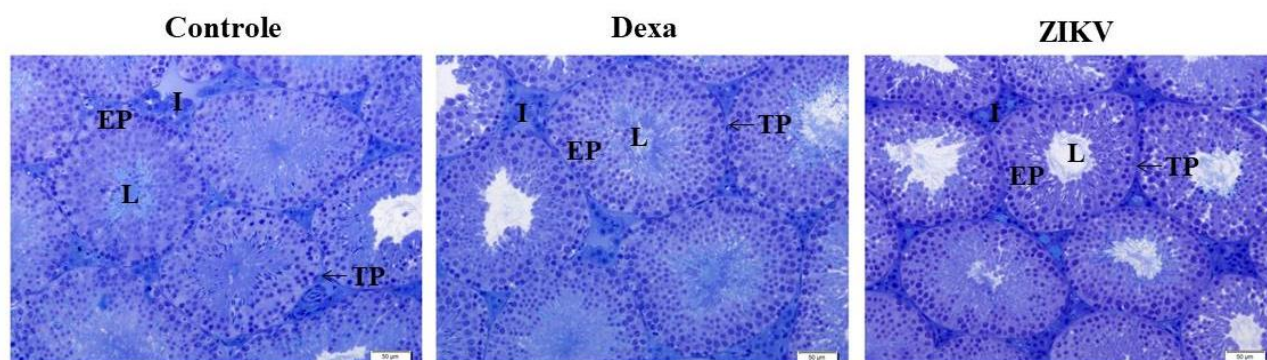


Figura 1: Fotomicrografia do parênquima testicular dos grupos Controle, Dexa (dexametasona) e ZIKV (Zika vírus). L- Lume; Ep- Epitélio seminífero; I- Intertúbulo; TP- Túnica própria. Corte de 3 µm corados com Azul de toluidina. Barra: 50µm

Tabela 2. Proporção dos componentes tubulares e índices tubulossomático e epiteliossomático, de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

	Controle	Dexa	ZIKV
Túbulo seminífero (%)	90,16 ± 2,33 ^a	89,56 ± 1,90 ^a	88,80 ± 0,92 ^a
Epitélio seminífero (%)	69,70 ± 1,22 ^a	66,66 ± 1,24 ^a	64,83 ± 3,26 ^b
Túnica própria (%)	7,25 ± 0,71 ^a	9,01 ± 0,53 ^b	10,71 ± 1,08 ^b
Lume (%)	13,21 ± 1,73 ^a	13,89 ± 0,55 ^a	13,26 ± 1,59 ^a

Dados expressos como média±DP. Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Na morfometria de túbulo seminífero, o comprimento de túbulo por testículo aumentou no grupo ZIKV quando comparado com o grupo Controle (Tabela 3).

Tabela 3. Morfometria de túbulo seminífero de camundongos Balb/c infectados com ZIKV.

Túbulo seminífero	Controle	Dexa	ZIKV
Diâmetro (μm)	187,30 \pm 11,37 ^a	183,19 \pm 7,18 ^a	186,07 \pm 20,42 ^a
Altura do Epitélio (μm)	57,71 \pm 2,27 ^a	55,80 \pm 2,31 ^a	54,21 \pm 5,36 ^a
Diâmetro Luminal (μm)	71,88 \pm 7,42 ^a	71,58 \pm 6,72 ^a	77,66 \pm 9,90 ^a
CTT/t (m)	4,36 \pm 2,32 ^a	4,40 \pm 0,74 ^a	7,10 \pm 1,33 ^b
CTT/gT (m/g)	23,88 \pm 12,65 ^a	32,63 \pm 5,13 ^a	32,35 \pm 6,41 ^a
Área do túbulo ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$)	27620,00 \pm 3377,85 ^a	26444,26 \pm 3730,22 ^a	27386,39 \pm 5280,52 ^a
Área do lume ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$)	4090,05 \pm 833,84 ^a	4050,71 \pm 779,04 ^a	4795,48 \pm 1210,82 ^a
Área do epitélio ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$)	23529,95 \pm 2574,25 ^a	22393,55 \pm 2985,47 ^a	22590,91 \pm 4154,61 ^a
RTE †	1,17 \pm 0,02 ^a	1,18 \pm 0,01 ^a	1,21 \pm 0,02 ^a

CTS/t- Comprimento total de túbulo seminífero; CTS/g- Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo e RET – Relação túbulo/Epitélio. Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Contagem das células no estágio 1

O número de células de Sertoli por grama de testículo aumentou no grupo Dexa. A produção espermática diária por testículo diminuiu no grupo ZIKV e a produção espermática diária por grama de testículo foi maior apenas no grupo Dexa (Tabela 4).

Tabela 4. Número corrigido de células no estágio I do ciclo do epitélio seminífero, razões entre os tipos celulares, número de células de Sertoli e produção espermática diária, de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

	Controle	Dexa	ZIKV
Espermatogônia	2,17 ± 0,36 ^a	1,68 ± 0,36 ^a	1,85 ± 0,16 ^a
Pré-leptóteno/leptóteno	25,71 ± 1,96 ^a	26,31 ± 4,24 ^a	23,47 ± 2,82 ^a
Paquíteno	30,80 ± 3,02 ^a	29,59 ± 3,78 ^a	27,09 ± 4,12 ^a
Espermátide arredondada	74,16 ± 6,27 ^a	69,18 ± 8,43 ^a	63,55 ± 5,55 ^a
Célula de Sertoli	5,58 ± 0,28 ^a	5,81 ± 0,96 ^a	5,44 ± 0,48 ^a
Índice Mitótico	12,16 ± 2,16 ^a	16,03 ± 2,32 ^a	12,80 ± 1,24 ^a
Índice Meiótico	2,41 ± 0,09 ^a	2,34 ± 0,22 ^a	2,36 ± 0,21 ^a
ICS	13,42 ± 1,13 ^a	12,00 ± 1,59 ^a	11,73 ± 0,93 ^a
SER/Ts	5,84 ± 0,55 ^a	6,22 ± 1,99 ^a	5,41 ± 0,81 ^a
SER/gt	32,07 ± 1,45 ^a	45,16 ± 3,90 ^b	25,23 ± 5,86 ^a
CSS	24,02 ± 1,94 ^a	21,95 ± 2,22 ^a	21,37 ± 1,26 ^a
RGE	35,04 ± 6,77 ^a	42,61 ± 9,28 ^a	34,99 ± 5,47 ^a
PDE/t	4,11x10 ⁶ ± 6,98x10 ^{5a}	5,03x10 ⁶ ± 1,21x10 ^{6a}	2,50x10 ⁶ ± 8,97x10 ^{5b}
PDE/gt	2,26x10 ⁷ ± 3,45x10 ^{6a}	3,99x10 ⁷ ± 1,97x10 ^{7b}	1,18x10 ⁷ ± 6,15x10 ^{6a}

ICS – Índice de célula de Sertoli; SER/t – Número de célula de Sertoli por testículo; SER/gt – Número de célula de Sertoli por grama e testículo; CSS – Capacidade de suporte de Sertoli; RGE – Rendimento geral da espermatogênese; PDE/t – Produção espermática diária por testículo; PDE/gt – Produção espermática diária por grama de testículo. Dados expressos como média±DP. Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Histopatologia testicular

Houve aumento de patologias leves no grupo ZIKV quando comparados ao grupo Controle (Figura 2).

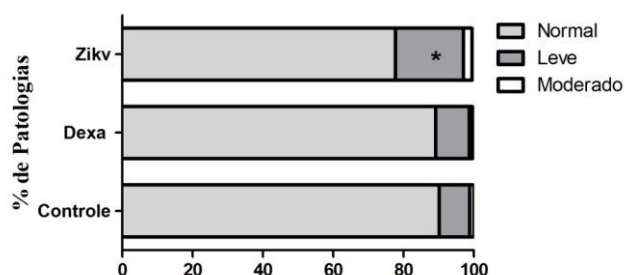


Figura 2: Proporção de túbulos seminíferos patológicos de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

Viabilidade das Células Germinativas

Houve aumento de dano celular inicial e morte celular no grupo ZIKV, quando comparados ao grupo controle (Figura 3).

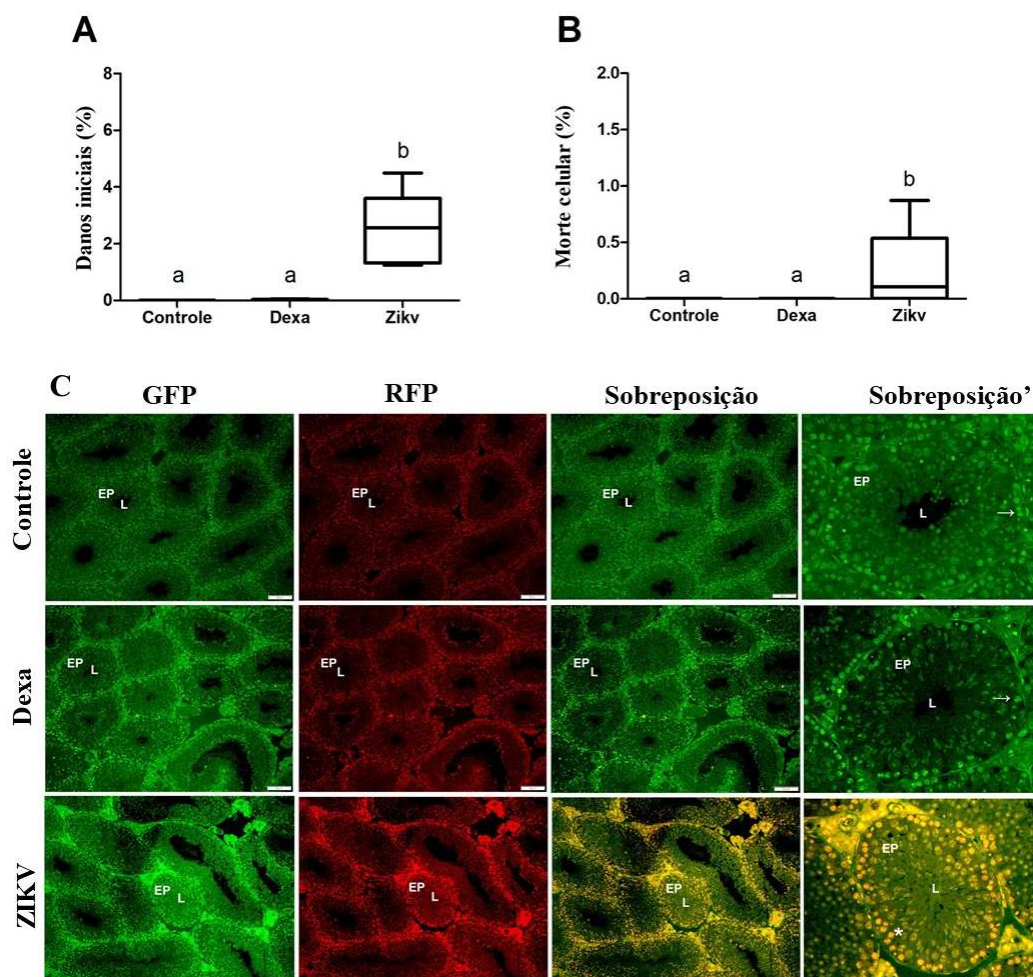


Figura 3: (A) Proporção de células com danos iniciais; (B) Proporção de células em morte celular; (C) Corte histológico de 1 μm do testículo de camundongos Balb/c infectados ZIKV. GFP - filtro 488 nm; RFP -580 nm; Sobreposição - imagens de sobreposição; Sobreposição' - imagem mesclada ampliada. Ep - epitélio; L - lúmen; \rightarrow - Núcleos verdes - células viáveis; * -Núcleos amarelos - processo de morte celular precoce. Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls). Barra: 50 μm

Histomorfometria Intertubular

A microestrutura e composição do intertúbulo podem ser observadas na Figura 4. Não houve alterações significativas na proporção dos componentes do intertúbulo nos grupos em comparação ao grupo Controle (Tabela 5).

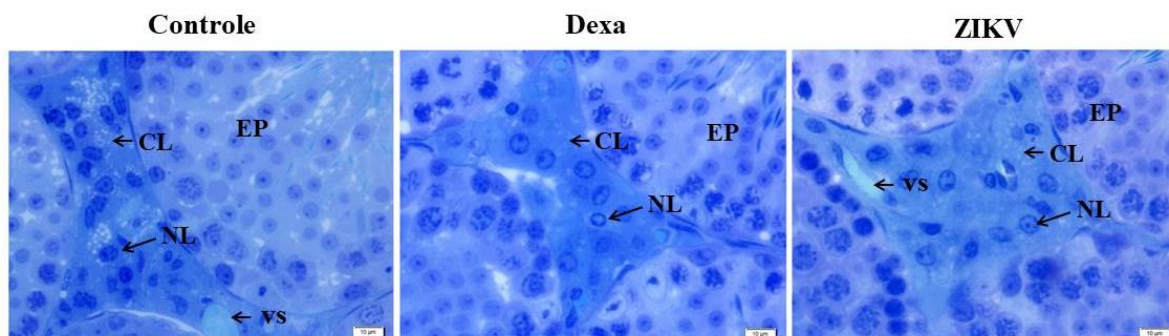


Figura 4: Fotomicrografia da estrutura e composição intertubular dos grupos Controle, Dexa (dexametasona) e ZIKV (Zika vírus). NL- Núcleo de Célula de Leydig; CL- Citoplasma de Célula de Leydig; VS- Vaso sanguíneo; EP-Epitélio seminífero. Corte de 3 µm corados com Azul de toluidina. Barra: 10µm

Tabela 5. Proporção dos componentes do intertúbulo de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

	Controle	Dexa	ZIKV
Intertúbulo (%)	9,84 ± 2,33 ^a	10,44 ± 1,90 ^a	11,80 ± 1,26 ^a
Vaso sanguíneo (%)	0,97 ± 0,77 ^a	0,62 ± 0,46 ^a	0,91 ± 0,46 ^a
Espaço Linfático (%)	1,00 ± 0,81 ^a	1,00 ± 0,68 ^a	1,00 ± 0,77 ^a
Núcleo de Leydig (%)	1,00 ± 0,43 ^a	0,14 ± 0,44 ^a	1,28 ± 0,31 ^a
Citoplasma de Leydig (%)	6,51 ± 1,83 ^a	7,43 ± 0,88 ^a	8,30 ± 1,53 ^a
Leydig (%)	7,52 ± 2,21 ^a	8,57 ± 1,26 ^a	9,58 ± 1,75 ^a
Conjuntivo (%)	0,34 ± 0,19 ^a	0,21 ± 0,07 ^a	0,27 ± 0,08 ^a
Macrófago (%)	0,02 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,02 ^a	0,03 ± 0,02 ^a

Dados expressos como média±DP. Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Não houve alterações nos parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig, diâmetro nuclear e volume do núcleo de Leydig quando comparado com o grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6: Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

Célula de Leydig	Controle	Dexa	ZIKV
Diâmetro Nuclear (μm^3)	6,47 \pm 0,15 ^a	6,42 \pm 0,17 ^a	6,47 \pm 0,25 ^a
Volume do Núcleo (μm^3)	142,19 \pm 10,14 ^a	138,70 \pm 10,75 ^a	142,36 \pm 15,91 ^a
Volume do citoplasma (μm^3)	962,02 \pm 178,98 ^a	983,23 \pm 313,79 ^a	940,78 \pm 192,56 ^a
Volume da célula (μm^3)	1104,21 \pm 177,35 ^a	1121,93 \pm 324,54 ^a	1083,14 \pm 198,74 ^a
Volume / t ($\times 10^6$)	0,013 \pm 0,004 ^a	0,012 \pm 0,006 ^a	0,020 \pm 0,003 ^a
Volume / gt ($\times 10^6$)	0,07 \pm 0,02 ^a	0,08 \pm 0,01 ^a	0,09 \pm 0,02 ^a
Número / t ($\times 10^6$)	1,20 $\times 10^7 \pm 6,33 \times 10^{6a}$	1,24 $\times 10^7 \pm 1,02 \times 10^{7a}$	1,92 $\times 10^7 \pm 4,65 \times 10^{6a}$
Número / gt ($\times 10^6$)	6,47 $\times 10^7 \pm 2,89 \times 10^{7a}$	7,97 $\times 10^7 \pm 3,70 \times 10^{7a}$	8,95 $\times 10^7 \pm 2,67 \times 10^{7a}$
Índice Leydigossomático (%)	0,04 \pm 0,01 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a

Dados expressos como média \pm DP. Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Testosterona

Os níveis de testosterona apresentaram dentro da normalidade quando comparado com o grupo Controle (Figura 5).

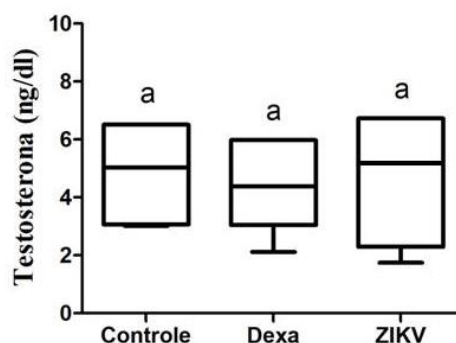


Figura 5: Concentração de testosterona sérica de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

Contagem de células no testículo e epidídimo

O número de espermátides por testículo diminuiu nos grupos experimentais quando comparados ao controle, porém o grupo Dexa aumentou o número de espermatozoide por grama de testículo. A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo

diminuiu no grupo ZIKV. O número de espermatozoides no corpo e na cauda do epidídimo, por grama do órgão, também diminuiu no grupo ZIKV, e o tempo de trânsito no corpo e cauda aumentou no grupo ZIKV. O número de espermatozoides na cauda, por epidídimo e por grama de epidídimo, diminuiu em todos os grupos quando comparado com o grupo controle, sendo que o tempo de trânsito na cauda diminuiu apenas no grupo Dexa (Tabela 7).

Tabela 7: Parâmetros de contagem de células no testículo e epidídimo de camundongos Balb/c infectados com Zika vírus (ZIKV).

	Controle	Dexa	ZIKV
Número de espermátide /t	9,81 ± 0,04 ^a	6,46 ± 1,58 ^b	2,26 ± 0,40 ^b
Número de espermátide /gt	28,31 ± 2,04 ^a	90,45 ± 14,98 ^b	27,63 ± 7,49 ^a
PED/t	1,73 ± 0,52 ^a	1,33 ± 0,33 ^a	0,47 ± 0,08 ^b
PED /gt	17,25 ± 5,32 ^a	13,60 ± 2,04 ^a	3,84 ± 0,55 ^b
Número de espermatozoide CC/Org	3,79 ± 1,83 ^a	3,73 ± 2,10 ^a	1,96 ± 0,59 ^a
Número de espermatozoide CC/gOrg	153,75 ± 31,25 ^a	135,42 ± 64,84 ^a	54,17 ± 13,77 ^b
Tempo de trânsito CC (Dias)	2,11 ± 0,54 ^a	2,77 ± 1,33 ^a	4,21 ± 1,01 ^b
Número de espermatozoide C/Org	5,17 ± 1,45 ^a	2,24 ± 0,19 ^b	1,34 ± 0,28 ^b
Número de espermatozoide na C/gOrg	275,83 ± 60,29 ^a	166,67 ± 37,44 ^b	71,67 ± 19,09 ^b
Tempo de trânsito C (dias)	3,06 ± 0,55 ^a	1,74 ± 0,40 ^b	2,87 ± 0,39 ^a

PED: produção espermática diária. CC: cabeça e corpo do epidídimo. C: Cauda do epidídimo. Dados expressos como média±DP. N = 4 machos/grupo. Letras diferentes, entre tratamentos, diferem significativamente entre si (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

Motilidade e integridade de membrana do espermatozoide

O grupo ZIKV apresentou redução na motilidade espermática e na proporção de espermatozoides com membranas íntegras (Figura 6).

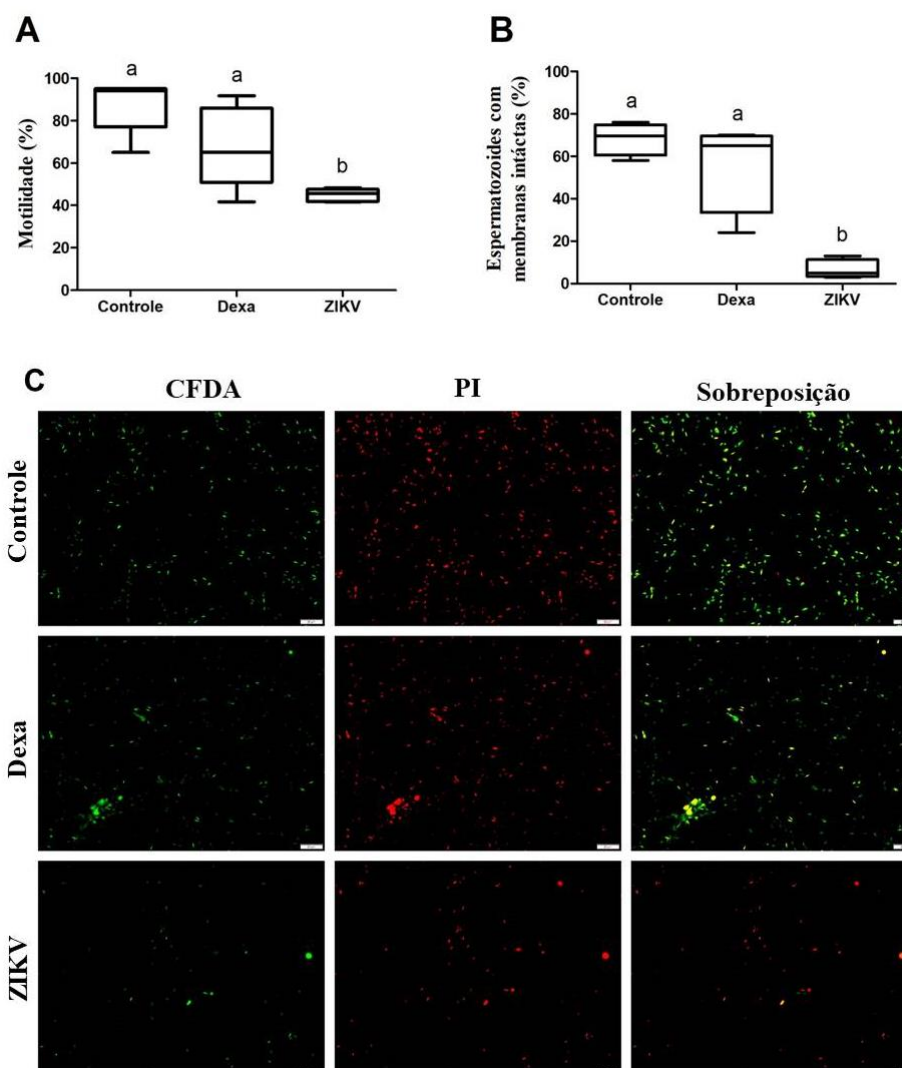


Figura 6: Motilidade espermática (A); Integridade de membrana espermática (B); (C) Membrana acrossômica marcada com diacetato de carboxifluoresceína (CFDA, Verde), o espermatozoide não intacto marcado na cabeça com iodeto de propídio (PI, Vermelho). Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls). Barra= 20 μ m.

Estresse Oxidativo do testículo e epidídimo

No testículo, a atividade da CAT aumentou no grupo Dexa, enquanto a atividade de GST diminuiu nos grupos Dexa e ZIKV, e o MDA reduziu no grupo Dexa. No epidídimo, houve aumento da SOD e também aumento nos níveis de NO e MDA no grupo ZIKV (Figura 7).

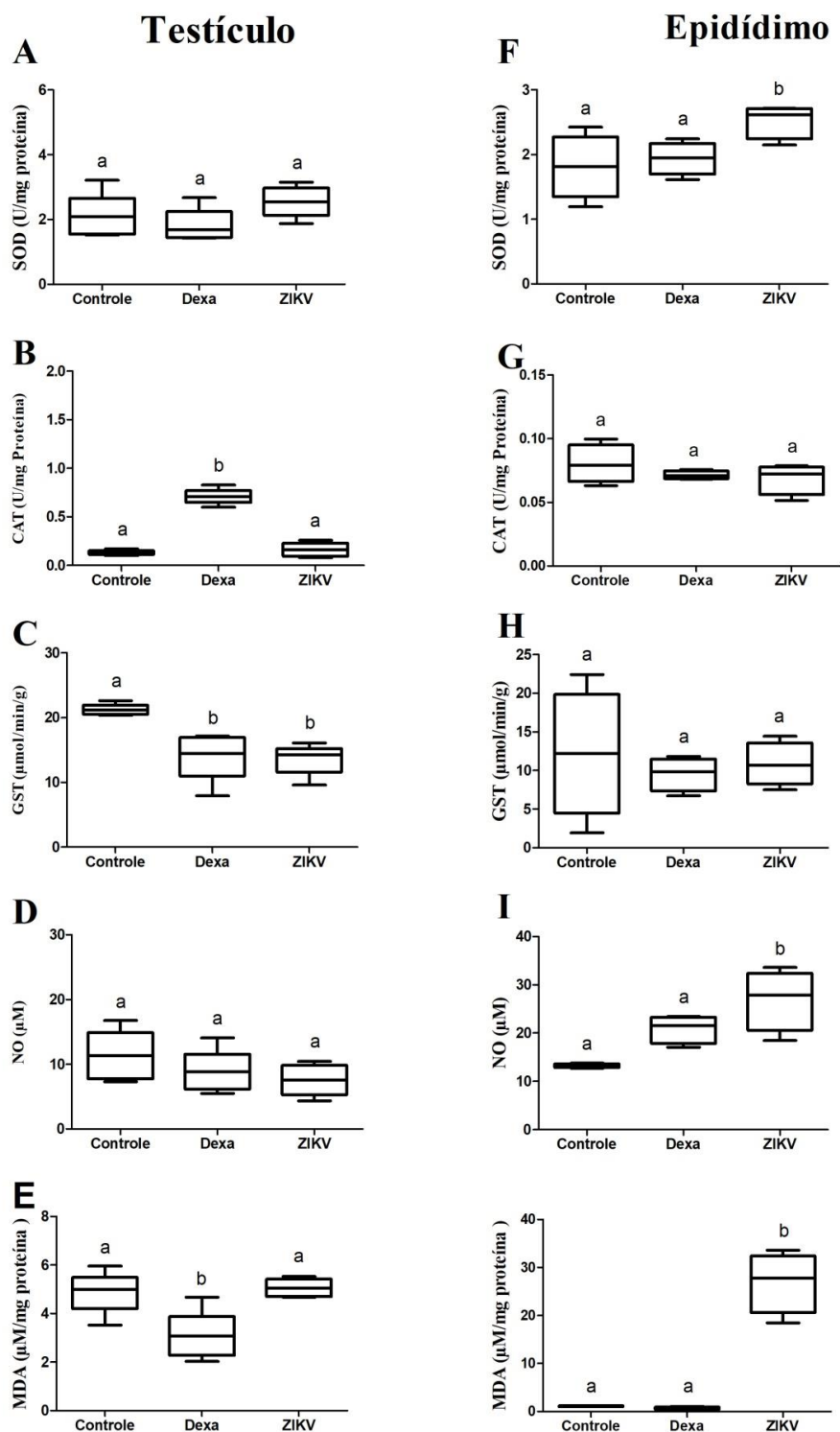


Figura 7: Avaliação do estresse oxidativo e nitrosativo no testículo e epidídimo de camundongos Balb/c infectados com ZIKV, 42 dias pós infecção. Atividade das enzimas antioxidantes no testículo e epidídimo: A e F - Superóxido dismutase (SOD); B e G - Catalase (CAT); C e H - Glutathione (GTS). Concentrações de D e I - óxido nítrico (ON) e J - malondialdeído (MDA). Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Determinação da capacidade antioxidante total (FRAP)

Houve redução na capacidade antioxidante total no grupo ZIKV (Figura 8).

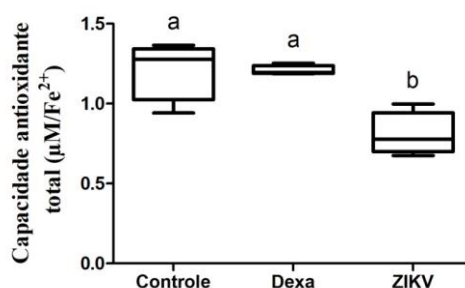


Figura 8: Capacidade antioxidante total do soro de camundongos BALB/c infectados Zika vírus (ZIKV). Letras diferentes entre tratamentos e controle diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) (Student Newman Keuls)

DISCUSSÃO

Estudos anteriores mostraram que a presença do ZIKV no testículo e epidídimo causa danos nesses órgãos com alterações na sua microarquitetura e prejuízos para a produção espermática (Govero et al., 2016; Ma et al., 2016). Neste estudo mostramos como o ZIKV, depois de 42 dias pós-infecção (dpi), altera a espermatogênese de camundongos Balb/c adultos, reduzindo a produção espermática, o trânsito espermático epididimário, com quadro de estresse nitrosativo e oxidativo no epidídimo, bem como alterações morfofisiológicas nos espermatozoides.

Embora os estudos com o ZIKV mostrem redução no peso testicular aos 14 e 21 dpi (Govero et al., 2016), neste estudo não se observaram alterações nos pesos testicular, parenquimal e albugíneo ou no índice gonadossomático (IGS), provavelmente por ter sido analisado aos 42 dpi, com recuperação desses parâmetros. Com relação aos parâmetros histomorfométricos, houve queda na porcentagem de epitélio seminífero nos grupos Dexa e ZIKV. Silva (2020) também observou queda no percentual de epitélio em animais infectados por ZIKV e analisados 42 dpi. O aumento de túnica própria, observado nos grupos ZIKV e Dexa, pode estar associado à produção excessiva de fibras colágenas estimuladas pela decorina ligada à fibrilogênese de testículos inférteis (Bhide et al., 2005; Orgel et al., 2009; Adam et al., 2011). Embora não tenham existido alterações estatisticamente significativas na área e no diâmetro tubulares, a redução nos valores desses parâmetros refletiu no aumento do comprimento de túbulo seminífero por testículo no grupo ZIKV, como uma forma de compensação na tentativa de manter a produção espermática. No entanto as mortes celulares causa redução na produção espermática, mesmo com o aumento do comprimento do túbulo.

Devido às alterações funcionais ocasionadas pela infecção, a produção espermática por testículo foi reduzida no grupo ZIKV. Essa redução provavelmente deve-se ao fato do ZIKV induzir autofagia seguida de apoptose para promover a replicação viral na célula hospedeira e assim, poder se dissipar (Hamel et al., 2015). As espermatogônias, espermatócitos primários e células de Sertoli são alvos na infecção por ZIKV (Govero et al., 2016). Como consequência, a viabilidade celular das células germinativas dos animais infectados com ZIKV ficou comprometida. As células mais afetadas foram as basais, com danos iniciais ao DNA, marcadas em amarelo pela técnica de laranja de acridina e iodeto de propídio. Alterações histopatológicas no epitélio seminífero de nível leve nos grupos ZIKV, com a presença de vacúolos na base e no ápice do epitélio seminífero, indicando possível perda da barreira hematotesticular das células de Sertoli, ocasionando na descamação das células do epitélio para o lume tubular (Lanning et al., 2002).

A região do intertúbulo e os níveis de testosterona não foram alterados nos animais analisados em 42 dpi, embora estudos tenham comprovado que os animais infectados com ZIKV tiveram queda na produção da testosterona (14 e 21 dpi), sugerindo também que as células de Leydig são capazes de suportar a replicação e podem servir como um tipo de reservatório para o vírus (Govero et al., 2016; Uraki et al., 2017). Neste estudo, os animais analisados em 42 dpi, não mostraram alteração da testosterona, indicando que a produção hormonal pode ter diminuído, mas o organismo conseguiu reverter esta queda, voltando ao normal. Govero et al., (2016) observaram que as células de Leydig são modificadas e todo o seu funcionamento é alterado devido ao processo inflamatório viral.

Para confirmar a queda da produção espermática, a contagem de espermátides e espermatozoides resistentes se torna importante. Nos grupos Dexta e ZIKV houve queda na contagem de espermátide por testículo, sendo a produção espermática diária afetada, reduzindo no grupo ZIKV. Os espermatozoides têm a viabilidade reduzida quando estão armazenados há muito tempo no epidídimo, sendo a cabeça e o corpo do epidídimo responsáveis pela maturação dos espermatozoides. Assim, quando o tempo de trânsito nestas regiões aumenta, pode haver número menor de espermatozoides presentes, fazendo com que a movimentação não seja eficaz e a eficiência do transporte seja reduzida (Johnson & Varner, 1988). O número de espermatozoides no corpo e na cauda do epidídimo no grupo ZIKV, embora não tenha sido significativo estatisticamente, sofreu redução em valor, mostrando uma tendência para alteração em decorrência do aumento no tempo de trânsito epididimário. Somente o grupo ZIKV apresentou atraso no tempo de trânsito nestas regiões do órgão.

Conseqüentemente, notou-se número reduzido de espermatozoides na região da cauda do epidídimo nesse grupo, também observado no grupo Dexa, em que o tempo de trânsito foi menor nesta região. Sendo o tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo acelerado ou retardado, os parâmetros espermáticos são afetados (Fernandez et al., 2008).

Não apenas o número de espermatozoides foi reduzido no epidídimo, mas também a motilidade espermática no grupo ZIKV. As doenças virais são responsáveis por causar a injúria celular com produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Ivanov et al., 2017). Em condições normais, as EROs são produzidas pelo metabolismo celular, mas quando se encontram em altos níveis, o quadro de estresse oxidativo ocorre, fazendo com que haja desequilíbrio entre os oxidantes e os agentes antioxidantes (Valko et al., 2007). Os espermatozoides são vulneráveis ao estresse oxidativo e, por não possuírem um sistema de reparo, são incapazes de restaurar os danos causados (Kurkowska et al., 2020). Neste trabalho os níveis elevados de MDA no epidídimo, indicador de peroxidação lipídica (Janero, 1990), confirmam que o estresse oxidativo ocorreu no grupo ZIKV. Existe uma correlação negativa entre a motilidade espermática e níveis elevados de MDA, pois é capaz de tornar os espermatozoides disfuncionais, por alterações na membrana (Subramanian et al., 2018). Outra alteração importante observada neste trabalho foi a redução de espermatozoides com membranas íntegras no grupo ZIKV. Ainda de acordo Subramanian et al. (2018), a perda da integridade da membrana pode ser desencadeada pela peroxidação lipídica, com o aumento da permeabilidade celular, desativação de enzimas, deterioração estrutural do DNA e morte celular.

A redução da motilidade espermática também pode ser devida à ação do H_2O_2 , que danifica o DNA mitocondrial e a produção de ATP diminui, sendo o mecanismo de motilidade afetado (Morielli & O'Flaherty, 2015). A SOD, que aumentou no epidídimo do grupo ZIKV, é responsável por catalisar o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mas o H_2O_2 é capaz de atravessar as membranas celulares com facilidade, tornando-se prejudicial por gerar o radical hidroxila (OH^\cdot). A CAT é encarregada de decompor o H_2O_2 em uma molécula de água e uma de oxigênio (Barreiros et al., 2006), porém ela não foi alterada no presente trabalho. O NO elevado do grupo ZIKV no epidídimo também contribuiu para a ocorrência do estresse, pois em níveis elevados é potencialmente tóxico e promove o estresse nitrosativo (Dusse et al., 2003)

No testículo o perfil das enzimas antioxidantes foi diferente. O aumento da CAT no grupo Dexa mostrou que houve aumento de sua atividade para neutralizar os efeitos dos

radicais produzidos, comprovando sua eficácia com os níveis de MDA reduzidos. A GST que é responsável pelo início da desintoxicação de agentes com potencial alquilante (Habig et al., 1974; Barreiros et al., 2006) ficou reduzida nos grupos Dexa e ZIKV, indicando que houve exaustão e que este sistema de defesa foi eficiente em 42 dpi, sendo que o nível de MDA também não alterou no grupo ZIKV, como no grupo Dexa.

A infecção pelo ZIKV causou alterações enzimáticas nos testículos e epidídimos como visto anteriormente, mas a interferência do vírus não foi apenas nestes órgãos, pois de acordo com a redução do FRAP, que é o indicativo da quantidade total de antioxidante não enzimático circulante no soro (Samudi et al., 2009), mostrou que o ZIKV interferiu de forma sistêmica.

CONCLUSÕES

Concluimos que o ZIKV 42 dpi tem interferência direta nas células dos túbulos seminíferos, reduz o epitélio, compromete a microarquitetura testicular, bem como a produção espermática. Os espermatozoides têm a motilidade e a integridade de membrana afetada pelo aumento dos níveis de MDA e NO, no epidídimo, gerados pelo quadro de estresse oxidativo epididimário.

CONCLUSÃO GERAL

Concluimos que o MAYV e o ZIKV causam danos semelhantes ao sistema reprodutor masculino, com o atraso do desenvolvimento dos túbulos seminíferos, aumento de histopatologias tubulares e consequente queda na produção espermática. No entanto, o MAYV parece ter efeito maior nas células de Leydig e apenas o ZIKV foi capaz de aumentar o tempo de trânsito epididimário. Pode-se dizer que o efeito causado pelo MAYV na espermatogênese foi de forma indireta, através das alterações das células de Leydig, enquanto o ZIKV interferiu diretamente nas células do túbulo seminífero.

REFERÊNCIAS

- Adam, M., Schwarzer, J. U., Khn, F. M., Strauss, L., Poutanen, M., & Mayerhofer, A. (2011). Mast cell tryptase stimulates production of decorin by human testicular peritubular cells: Possible role of decorin in male infertility by interfering with growth factor signaling. *Human Reproduction*, *26*(10), 2613–2625.
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. (2006). Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quimica Nova*, *29*(1), 113–123.
- Bhide, V. M., Laschinger, C. A., Arora, P. D., Lee, W., Hakkinen, L., Larjava, H., Sodek, J., & McCulloch, C. A. (2005). Collagen phagocytosis by fibroblasts is regulated by decorin. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(24), 23103–23113.
- Dusse, L. M., Vieira, L. M., & Carvalho, M. das G. (2003). Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, *39*(4), 343–350.
- Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M., & Rousset, D. (2016). Zika virus genome from the Americas. *The Lancet*, *387*(10015), 227–228.
- Fernandez, C. D. B., Porto, E. M., Arena, A. C., & De Kempinas, W. G. (2008). Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *International Journal of Andrology*, *31*(4), 427–437.
- Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S. M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D. J., Gorman, M. J., Richner, J. M., Caine, E. A., Salazar, V., Moley, K. H., & Diamond, M. S. (2016). Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*, *540*(7633), 438–442.
- Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S. M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D. J., Gorman, M. J., Richner, J. M., Caine, E. A., Salazar, V., Moley, K. H., & Diamond, M. S. (2016). Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*, *540*(7633), 438–442.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, *249*(22), 7130–7139.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombatpattana, P., Talignani, L., Thomas, F., Cao-Lormeau, V.-M., Choumet, V., Briant, L., Desprès, P., Amara, A., Yssel, H., & Missé, D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology*, *89*(17), 8880–8896.
- Ivanov, A. V., Bartosch, B., & Isagulians, M. G. (2017). Oxidative stress in infection and consequent disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 10–13.

- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 515–540.
- Johnson, L., & Varner, D. D. (1988). Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biology of Reproduction*, 39(4), 812–817.
- Kumar, A., Jovel, J., Lopez-Orozco, J., Limonta, D., Airo, A. M., Hou, S., Stryapunina, I., Fibke, C., Moore, R. B., & Hobman, T. C. (2018). Human sertoli cells support high levels of zika virus replication and persistence. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11.
- Kurkowska, W., Bogacz, A., Janiszewska, M., Gabryś, E., Tiszler, M., Bellanti, F., Kasperczyk, S., Machoń-Grecka, A., Dobrakowski, M., & Kasperczyk, A. (2020). Oxidative Stress is Associated with Reduced Sperm Motility in Normal Semen. *American Journal of Men's Health*, 14(5).
- Lanning, L. L., Creasy, D. M., Chapin, R. E., Mann, P. C., Barlow, N. J., Regan, K. S., & Goodman, D. G. (2002). Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicologic Pathology*, 30(4), 507–520.
- Lemke, G., & Rothlin, C. V. (2008). Immunobiology of the TAM receptors. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 327–336.
- Liu, W., Han, R., Wu, H., & Han, D. (2018). Viral threat to male fertility. *Andrologia*, 50(11), 1–9.
- Ma, W., Li, S., Ma, S., Jia, L., Zhang, F., Zhang, Y., Zhang, J., Wong, G., Zhang, S., Lu, X., Liu, M., Yan, J., Li, W., Qin, C., Han, D., Qin, C., Wang, N., Li, X., & Gao, G. F. (2016). Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell*, 167(6), 1511–1524.e10.
- Mansuy, J. M, Suberbielle, E., Chapuy-Regaud, S., Mengelle, C., Bujan, L., Marchou, B., Delobel, P., Gonzalez-Dunia, D., Malnou, CE, Izopet, J e Martin-Blondel, G., 2016. Zika virus in semen and spermatozoa. *The Lancet Infectious Diseases*, , 16 (10),1106-1107.
- Marano, G., Pupella, S., Vaglio, S., Liunbruno, G. M., & Grazzini, G. (2016). Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and Transfusion Medicine. *Blood Transfusion*, 14(2), 95–100. Masmajan, S., Musso, D., Vouga, M., Pomar, L., Dashraath, P., Stojanov, M., Panchaud, A., & Baud, D. (2020). Zika Virus. *Pathogens*, 9(11), 1–14.
- Mead, P. S., Duggal, N. K., Hook, S. A., Delorey, M., Fischer, M., Olzenak McGuire, D.,

- Becksted, H., Max, R. J., Anishchenko, M., Schwartz, A. M., Tzeng, W.-P., Nelson, C. A., McDonald, E. M., Brooks, J. T., Brault, A. C., & Hinckley, A. F. (2018). Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *New England Journal of Medicine*, 378(15), 1377–1385.
- Morielli, T., & O’Flaherty, C. (2015). Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. *Reproduction*, 149(1), 113–123.
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V. M. (2015). Potential sexual transmission of zika virus. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2), 359–361.
- Orgel, J. P. R. O., Eid, A., Antipova, O., Bella, J., & Scott, J. E. (2009). Decorin core protein (decoron) shape complements collagen fibril surface structure and mediates its binding. *PLoS ONE*, 4(9).
- Samudi, C., Govind, S. K., Bustam, A. Z., & Kuppusamy, U. R. (2009). Attenuation of hydrogen peroxide and ferric reducing/antioxidant power serum levels in colorectal cancer patients with intestinal parasitic infection. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 16(2), 15–20.
- Siemann, D., Strange, D., Maharaj, P., Shi, P. Y., & Verma, S. (2017). Zika Virus Infects Human Sertoli Cells. *Journal of Virology*, 91(22), 1–17.
- Silva, A. A. (2020). A infecção pelo vírus ZIKA causa alterações morfológicas testiculares e espermáticas em camundongos BALB/C adultos. Universidade Federal de Pernambuco.p.74. (Dissertação, metrado)
- Subramanian, V., Ravichandran, A., Thiagarajan, N., Govindarajan, M., Dhandayuthapani, S., & Suresh, S. (2018). Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 45(2), 88–93.
- Uraki, R., Hwang, J., Jurado, K. A., Householder, S., Yockey, L. J., Hastings, A. K., Homer, R. J., Iwasaki, A., & Fikrig, E. (2017). Zika virus causes testicular atrophy. *Science Advances*, 3(2), 1–7.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Weidner, W., Pilatz, A., Diemer, T., Schuppe, H. C., Rusz, A., & Wagenlehner, F. (2013). Male urogenital infections: Impact of infection and inflammation on ejaculate

parameters. *World Journal of Urology*, 31(4), 717–723.