

## ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS TESTICULARES ASSOCIADAS A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR VÍRUS ZIKA EM MACACOS-DE-CHEIRO

*(Testicular histopathological changes associated with  
experimental infection by zika virus in squirrel monkeys)*

Josye Bianca SANTOS\*<sup>1</sup>; Gabriela da Costa BENCHIMOL<sup>2</sup>; Jade OHANA<sup>3</sup>; Bianca Nascimento de ALCANTARA<sup>4</sup>; Washington Luiz Assunção PEREIRA<sup>5</sup>; Andreza Nazareth Viana MENDES<sup>6</sup>; Sarah Raphaella Rocha de Azevedo SCALERCIO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia, Universidade Federal do Pará, Campus Castanhal. Av. dos Universitários, Jaderlândia, Castanhal/PA. CEP: 68.746-360; <sup>2</sup>Instituto Evandro Chagas; <sup>3</sup>Universidade Federal Rural da Amazônia; <sup>4</sup>Centro Nacional de Primatas; <sup>5</sup>Laboratório de Patologia Animal; <sup>6</sup>Escola Superior da Amazônia. \*E-mail: [josyeb Santos@gmail.com](mailto:josyeb Santos@gmail.com)

### ABSTRACT

The Zika virus belongs to the family Flaviviridae, genus *Flavivirus*. It is an arbovirus whose main vectors are mosquitoes of the genus *Aedes*. Studies in rodents have shown that the persistence of the virus in the testicles causes damage to the reproductive tissue. This work aimed to study the effect of experimental infection by the Zika virus on fertility in non-human primates of the species *Saimiri collinsi*. Five pre-pubertal males ( $\leq 2$  years old) of the species *Saimiri collinsi* were used. Three animals were infected (infected group) with the strain of Zika virus BE H815744. Two other uninfected males were used as a negative control (uninfected group). Twenty-one days after infection, infected and uninfected males were euthanized. After euthanasia, they were referred for necroscopic examination for macroscopic and microscopic evaluation. During the necropsy, the testicles were collected and fixed in 10% formaldehyde. After fixation, the tissues were processed routinely and embedded in paraffin. The slides were stained with hematoxylin and eosin for histopathological evaluation. Histopathological changes were observed in the testis of three of the five animals. Different degrees of inflammation were identified, in addition to degeneration and/or necrosis. The three animals presented a reduced number of sperm cells, with no sperm and severe necrosis. The results obtained conclude that the Zika virus can cause pathological changes in the reproductive system of males of the species *Saimiri collinsi*.

**Key words:** Zika virus, testis, pathology, non-human primates.

### INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. É um arbovírus que apresenta como principais vetores os mosquitos do gênero *Aedes* (DICK, KITCHEN e HADDOW, 1952). Contudo, também pode ser transmitido através de relação sexual, vertical (transplacentária) e transfusão sanguínea (MOREIRA *et al.*, 2016; WEAVER *et al.*, 2016).

Complementarmente, a persistência da infecção por ZIKV parecer ser transitória e estudos publicados relatam enorme variação quanto ao tempo de detecção do RNA viral em diferentes espécimes amostrais (ATKINSON *et al.*, 2016; GASKELL *et al.*, 2017). Estudos em roedores mostraram que a persistência do ZIKV nos testículos causa danos aos túbulos seminíferos, atrofia testicular, oligospermia e consecutivamente redução das taxas de fertilidade (GOVERO *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2016; URAKI *et al.*, 2017).

Diante do atual cenário, vê-se a necessidade de estudos experimentais para compreender suas características, patogenicidade, bem como os efeitos que ainda pode causar sobre a fertilidade da população em risco de infecção pelo ZIKV, especialmente em machos pré-púberes. Nesse contexto, este trabalho teve por intuito estudar as alterações patológicas da infecção experimental pelo ZIKV sobre o sistema genial masculino em primatas não humanos (PNHs) da espécie *Saimiri collinsi*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os animais submetidos a este experimento integravam o plantel do Centro Nacional de Primatas (CENP). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IEC) do Instituto Evandro Chaga, sob o protocolo de n<sup>o</sup> 033/2018, sendo também autorizados junto ao SISBIO (ICMBio n<sup>o</sup> 52928-2).

Neste experimento foram utilizados cinco machos pré-púberes ( $\leq 2$  anos de idade) da espécie *Saimiri collinsi*. Três animais (AT-005, AT-156 e AT-163) foram infectados (grupo infectado) pela cepa de linhagem africana ZIKV BE H815744 (Faria *et al.*, 2016). O inóculo foi feito com 0,5mL de suspensão de células VERO infectadas, contendo  $1,0 \times 10^5$  PFU/mL, via intradérmica. Outros dois machos não infectados (AT-001 e AT-003) foram utilizados como controle negativo (grupo não infectado). Vinte e um dias após a infecção, os machos infectados e não infectados foram eutanasiados. Após a eutanásia, foram encaminhados ao exame necroscópico para a avaliação macroscópica e microscópica.

Durante a necropsia, os testículos foram coletados e fixados em formaldeído a 10%. Após a fixação, os tecidos foram processados rotineiramente e embebidos em parafina. Secções seriais de 5 $\mu$ m de espessura foram realizadas. Realizou-se coloração com hematoxilina e eosina (HE). Foi realizada uma avaliação histopatológica independente e as cegas das lâminas de HE. As análises foram feitas em 3 campos histológicos nos aumentos de 100x e 400x, como atualmente recomendado pelo International Harmonization of Toxicologic Pathology Nomenclature.

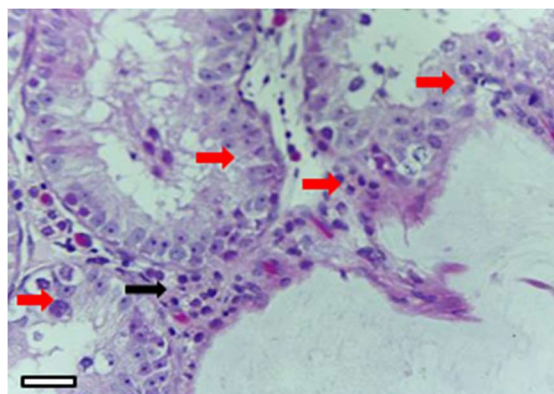
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas alterações histopatológicas no testículo de três (AT-005, AT-156 e AT-163) dos cinco PNHs machos que foram avaliados 21 dia pós-infecção (DPI). Observou-se diferentes graus de inflamação, além de degeneração e/ou necrose. A caracterização do processo inflamatório foi realizada pela presença de focos de células inflamatórias (neutrófilos, leucócitos ou linfócitos) no interstício, estando estas concentradas principalmente em torno de vasos sanguíneos de pequeno a médio calibre.

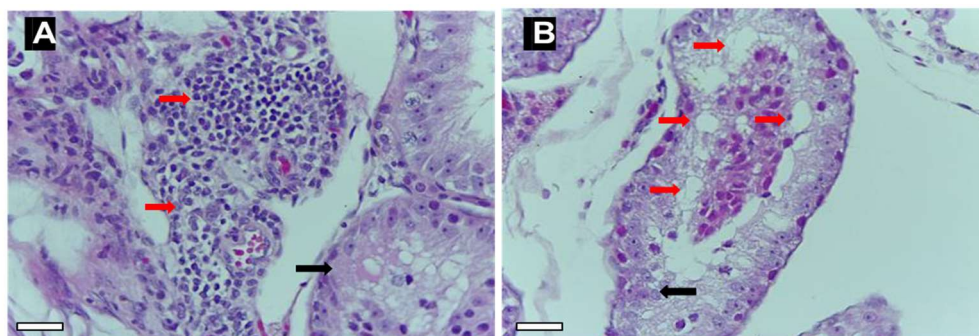
O animal AT-156 apresentou intensa degeneração do parênquima tubular, com infiltração de número exacerbado de neutrófilos sem a ruptura das membranas seminíferas basais, acompanhado de edema pericelular multifocal (Fig. 01). AT-005 e AT-163 apresentaram retração tubular devido a degeneração celular, além de edema intratubular e desorganização estrutural devido a necrose (Fig. 02). A ação de citocinas na resposta

imunológica ao ZIKV resulta no processo inflamatório e na eliminação de células infectadas (SCHOUEST *et al.*, 2020).

Observou-se no animal AT-163 foco de células inflamatórias no interstício. Tsetsarkin e colaboradores (2020) relataram o tropismo do ZIKV pelas células intersticiais, destacando a infecção de macrófagos como importante passo para a patogênese da doença no órgão. O mecanismo para a ruptura da barreira hemato-testicular na infecção de células intratubulares permanece desconhecido.



**Figura 01:** Testículo direito, animal AT-156, 21 DPI. Infiltração por neutrófilos (seta preta). Necrose das espermatídes e de células tubulares (setas vermelhas). HE. 400x. Barra de escala = 50µm.



**Figura 02:** A. Testículo, animal AT-005, 21 DPI. B. Testículo, animal AT-163, 21 DPI. Retração tubular em ambos os testículos, edema com inflamação (seta vermelha) e necrose (seta preta). HE. 400x. Barra de escala = 50µm.

Os três animais apresentaram número reduzido de células espermatogênicas, com ausência de espermatozoides e necrose severa (Fig. 01 e Fig. 02). Assim como descrito neste trabalho, Peregrine *et al.* (2019) constataram diminuição da espermatogênese em babuínos-anubis (*Papio anubis*) 10-11 DPI do ZIKV. Os autores também descreveram a presença de células inflamatórias no interstício, estendendo-se ao interior dos túbulos seminíferos. As lesões em células espermatogênicas podem causar infertilidade em machos, além de sugerir transmissão sexual do vírus pelo sêmen (MUSSO e GUBLER, 2016; LIU *et al.*, 2018).

## CONCLUSÕES

Assim como o descrito em outras espécies de primatas não humanos (PNHs), o *Saimiri collinsi* é susceptível a variante do ZIKV utilizada no estudo. Podemos concluir que o ZIKV pode causar alterações patológicas no sistema reprodutor de machos desta espécie. Modelos de PNHs seguem como excelente referência na realização de pesquisas biomédicas.

## REFERÊNCIAS

- ATKINSON, B.; THORBURN, F.; PETRIDOU, C.; BAILEY, D.; HEWSON, R.; SIMPSON, A.J.H.; BROOKS, T.J.G.; AARONS, E.J. Presence and Persistence of Zika Virus RNA in Semen, United Kingdom, 2016. *Emerging Infectious Diseases*, v.23, n.4, p.611-615, 2017.
- DICK, G.W.; KITCHEN, S.F.; HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.46, n.5, p. 509–520. 1952.
- FARIA, N.R.; AZEVEDO, R.S.S.; KRAEMER, M.U.G.; SOUZA, R.; CUNHA, M.S.; HILL, S.C.; THÉZÉ, J.; BONSALE, M.B.; BOWDEN, T.A.; RISSANEN, I.; ROCCO, I.M.; NOGUEIRA, J.S.; MAEDA, A.Y.; VASAMI, F.G.S.; MACEDO, F.L.L.; SUZUKI, A.; RODRIGUES, S.G.; CRUZ, A.C.R.; NUNES, B.T.; MEDEIROS, D.B.A.; RODRIGUES, D.S.G.; QUEIROZ, A.L.N.; SILVA, E.V.P.; HENRIQUES, D.F.; ROSA, E.S.T.; OLIVEIRA, C.S.; MARTINS, L.C.; VASCONCELOS, H.B.; CASSEB, L.M.N.; SIMITH, D.B.; MESSINA, J.P.; ABADE, L.; LOURENÇO, J.; ALCANTARA, J.C.J.; LIMA, M.M.; GIOVANETTI, M.; HAY, S.I.; OLIVEIRA, R.S.; LEMOS, P.S.; OLIVEIRA, L.F.; LIMA, C.P.S.; SILVA, S.P.; VASCONCELOS, J.M.; FRANCO, L.; CARDOSO, J.F.; VIANEZ-JÚNIOR, J.L.S.G., MIR, D.; BELLO, G.; DELATORRE, E.; KHAN, K.; CREATORE, M.; COELHO, G.E.; OLIVEIRA, W.K.; TESH, R.; PYBUS, O.G.; NUNES, M.R.T.; PEDRO, F.C.; VASCONCELOS, P.F.C. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*, v.352, n.6283, p.345–349, 2016.
- GASKELL, K.M.; HOULIHAN, C.; NASTOULI, E.; CHECKLEY, A.M. Persistent Zika Virus Detection in Semen in a Traveler Returning to the United Kingdom from Brazil, 2016. *Emerging Infectious Diseases*, v.23, n.1, p.137-139. 2017.
- 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. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*, v.540, n.7633, p.438–442. 2016.
- LIU, W.; HAN, R.; WU, H.; HAN, D. Viral threat to male fertility. *Andrologia*, v.50, n.11. p.1–9, 2018.
- 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. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. *Cell*, v.167, n.6, p.1511-1524. 2016.

MOREIRA, J.; PEIXOTO, T.M.; SIQUEIRA, A.M.; LAMAS, C.C. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*, v.23, n.5, p.296–305, 2017.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, v.29, n.3, p.487-524, 2016.

PEREGRINE, J.; GURUNG, S.; LINDGREN, M.C.; HUSAIN, S.; ZAVY, M.T.; MYERS, D.A.; PAPIN, J.F. Zika Virus Infection, Reproductive Organ Targeting, and Semen Transmission in the Male Olive Baboon. *Journal of Virology*, v.94, n.1, p.1–16, 2019.

SCHOUEST, B.; FAHLBERG, M.; SCHEEF, E.A.; WARD, M.J.; HEADRICK, K.; SZELTNER, D.M.; BLAIR, R.V.; GILBERT, M.H. DOYLE-MEYERS, L.A.; DANNER, V.W.; BONALDO, M.C.; WESSON, D.M.; PANGANIBAN, A.T.; MANESS, N.J. Immune outcomes of Zika virus infection in nonhuman primates. *Scientific Reports*, v.10, n.1, p.1–12, 2020.

TSETSARKIN, K.A.; ACKLIN, J.A.; LIU, G.; KENNEY, H.; TETERINA, N.L.; PLETNEV, A.G.; KIM, J.K. Zika virus tropism during early infection of the testicular interstitium and its role in viral pathogenesis in the testes. *PLOS Pathogens*, v.16, n.7, p.1–27, 2020.

URAKI, R.; HWANG, J.; JURADO, K.A.; HOUSEHOLDER, S.; YOCKEY, L.J.; HASTINGS, A.K.; HOMER, R.J.; IWASAKI, A.; FIKRIG, E. Zika virus causes testicular atrophy. *Science Advances*, v.3, n.2, p.1–7, 2017.

WEAVER, S.C.; COSTA, F.; GARCIA-BLANCO, M.A.; KO, A.I.; RIBEIRO, G.S.; SAADE, G.; SHI, P.; VASILAKIS, N. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Research*, v.130, n.1, p.69-80, 2016.